

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2005 年10 月13 日 (13.10.2005)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2005/095942 A1

(51) 国際特許分類: G01N 27/64, C12N 15/09, C12Q 1/68,
G01N 27/62, 33/483, 33/50, H01J 49/10, 49/40

フォーム (KABUSHIKI KAISHA DNAFORM) [JP/JP];
〒1080073 東京都港区三田一丁目 3-3 5 Tokyo (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2005/005809

(71) 出願人 および

(22) 国際出願日: 2005 年3 月29 日 (29.03.2005)

(72) 発明者: 林崎 良英 (HAYASHIZAKI, Yoshihide) [JP/JP];
〒3050061 茨城県つくば市稲荷前 2-2-8 Ibaraki (JP).

(25) 国際出願の言語: 日本語

(72) 発明者; および

(26) 国際公開の言語: 日本語

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 河合 純 (KAWAI, Jun) [JP/JP]; 〒2300045 神奈川県横浜市鶴見区末広町 1 丁目 7 番 2 2 号 独立行政法人理化学研究所 横浜研究所内 Kanagawa (JP). 林 利蔵 (HAYASHI, Toshizo) [JP/JP]; 〒1080073 東京都港区三田一丁目 3-3 5 株式会社ダナフォーム内 Tokyo (JP). 神谷 守 (KAMIYA, Mamoru) [JP/JP]; 〒1080073 東京都港区三田一丁目 3-3 5 株式会社ダナフォーム内 Tokyo (JP).

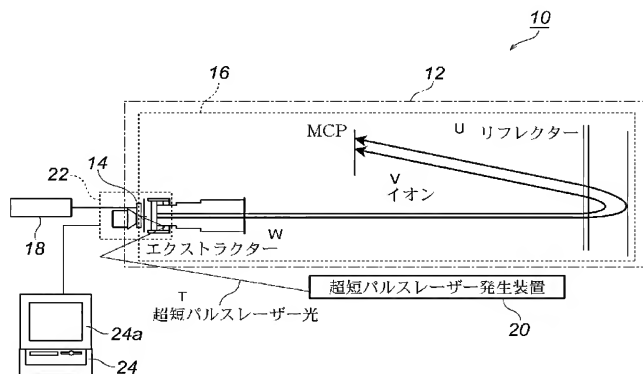
(30) 優先権データ:
特願2004-097260 2004 年3 月30 日 (30.03.2004) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 独立行政法人理化学研究所 (RIKEN) [JP/JP]; 〒3510198 埼玉県和光市広沢 2 番 1 号 Saitama (JP). 株式会社ダナ

[続葉有]

(54) Title: METHOD OF ANALYZING BIOSAMPLE BY LASER ABLATION AND APPARATUS THEREFOR

(54) 発明の名称: レーザーアブレーションを用いた生体試料の分析方法およびその装置



20... ULTRASHORT PULSE LASER GENERATING UNIT
T... ULTRASHORT PULSE LASER BEAM
U... REFLECTOR
V... ION
W... EXTRACTOR

(57) Abstract: A method of analyzing a biosample that enables substantial shortening of time required for analysis, further enabling obtaining highly reliable results through means for avoiding sway of analytical results depending on observers, and that enables one-time analysis of a multiplicity of genes, etc. on a single biosample to thereby enhance workload and time efficiencies, and that enables analysis of multiple genes, etc. under conditions completely free from any difference in background attributed to biosamples. There is provided a method comprising irradiating a biosample as an analyte with ultrashort pulse laser beams to thereby effect an ablation thereof so that molecules contained in the biosample are atomized into constituent elements, ionizing the constituent elements resulting from the atomization and analyzing the ionized constituent elements to thereby analyze analytical-target molecules of the biosample.

(57) 要約: 分析に要する時間を大幅に短縮することを可能にし、また、観察者により分析結果が左右されることのないようにして信頼性の高い結果を得ることを可能に、また、同一の生体試料上で一度に多数の遺伝子などを分析することができるようにして、作業労力的ならびに時間的な効率を向上するとともに、生体試料に由来するバックグラウンドの差が全く無い条件で複数の遺伝子などの解析を行うことを可能にするものであり、分析の対象である生体試料に超短パル

[続葉有]

WO 2005/095942 A1



(74) 代理人: 上島 淳一 (UESHIMA, Junichi); 〒1710021 東京都豊島区西池袋 1-5-1 1-4 0 4 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA,

SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

スレーザー光を照射してアブレーションすることにより、生体試料に含まれる分子を構成元素に原子化し、原子化した構成元素をイオン化し、イオン化した構成元素を分析することにより、生体試料中の分析を目的とする分子を分析する。

明 細 書

レーザーアブレーションを用いた生体試料の分析方法およびその装置 技術分野

- [0001] 本発明は、レーザーアブレーションを用いた生体試料の分析方法およびその装置に関し、さらに詳細には、従来と比較すると分析の効率を著しく向上することを可能にしたレーザーアブレーションを用いた生体試料の分析方法およびその装置に関し、例えば、生体試料として生体組織切片を用い、当該生体組織切片中の核酸の質量分析に用いて好適なレーザーアブレーションを用いた生体試料の分析方法およびその装置に関する。

背景技術

- [0002] 従来より、生体組織切片などの生体試料の分析の手法としては、種々の化学染色方法や核酸プローブのハイブリダイゼーションを利用した方法(in situハイブリダイゼーション法)などが主に使用されている。

ここで、化学染色方法は、組織内に含まれる物質の種類によって染色のされ方が異なることを利用し、組織、細胞の形態、解析対象となる物質の存在の有無や局在を顕微鏡下で観察するという手法である。

一方、in situハイブリダイゼーション法は、標識した核酸プローブと組織内に存在する核酸をハイブリダイゼーションさせて、細胞内で転写されているmRNAの検出や遺伝子の転写活性を観測することを可能とした手法である。

また、生体組織切片などの生体試料の分析には、上記した手法と同様に、標識抗体を用いた組織切片の解析などもよく使われている。

- [0003] しかしながら、上記した従来の各種の生体試料の分析の手法においては、染色や発色にかかる工程が煩雑で、分析に要する時間が長時間におよぶという問題点があった。

また、上記した従来の各種の生体試料の分析の手法においては、処理後の生体組織切片などを人が顕微鏡下で観察して解析する必要があるため、定性的な解析が主であるとともに、同じ切片を観察しても観察者の熟練度や主観により結果が異なると

いう問題点があった。

さらに、上記した従来の各種の生体試料の分析の手法においては、同じ生体組織切片では一度に2種類の遺伝子しか測定することができないため、生体組織切片に由来するバックグラウンドの差が全く無い条件で複数遺伝子の解析を行うことが困難であるという問題点があった。

[0004] なお、本願出願人が特許出願時に知っている先行技術は、上記において説明したようなものであって文献公知発明に係る発明ではないため、記載すべき先行技術情報は無い。

発明の開示

発明が解決しようとする課題

[0005] 本発明は、上記したような従来の技術の有する種々の問題点に鑑みてなされたものであり、その目的とするところは、従来の技術と比較すると分析に要する時間を大幅に短縮することを可能にしたレーザーアブレーションを用いた生体試料の分析方法およびその装置提供しようとするものである。

また、本発明の目的とするところは、観察者により分析結果が左右されることのないようにして、信頼性の高い結果を得ることを可能にしたレーザーアブレーションを用いた生体試料の分析方法およびその装置提供しようとするものである。

また、本発明の目的とするところは、同一の生体試料上で一度に多数の遺伝子などを分析することができるようにして、作業労力的ならびに時間的な効率を向上するとともに、生体試料に由来するバックグラウンドの差が全く無い条件で複数の遺伝子などの解析を行うことを可能にしたレーザーアブレーションを用いた生体試料の分析方法およびその装置提供しようとするものである。

また、本発明の目的とするところは、生体試料中の分子の質量分析を行う場合には、質量スペクトルの解析が困難になる恐れを排除するとともに、質量分析器に高分解能を要しないようにしたレーザーアブレーションを用いた生体試料の分析方法およびその装置を提供しようとするものである。

また、本発明の目的とするところは、生体試料中の分子を構成する構成原子の原子化とイオン化とを1台のレーザー源で同時に実現することを可能にして、レーザー

の照射制御を大幅に簡潔にすることを可能にしたレーザーアブレーションを用いた生体試料の分析方法およびその装置を提供しようとするものである。

また、本発明の目的とするところは、多種類の標識同位体が混入した状況においても、効率の良い分析を行うことを可能にしたレーザーアブレーションを用いた生体試料の分析方法およびその装置を提供しようとするものである。

課題を解決するための手段

[0006] 上記目的を達成するために、本発明によるレーザーアブレーションを用いた生体試料の分析方法およびその装置は、生体試料を超短パルスレーザー光でアブレーションすることにより、生体試料中の分子を原子イオン化して原子イオンを生成し、生成した原子イオンを分析するようにしたものである。これにより、生体試料中の分子の化学分析を行うことができるものである。

即ち、本発明のレーザーアブレーションを用いた生体試料の分析方法およびその装置においては、生体試料を超短パルスレーザー光でアブレーションすることにより、生体試料中の分子をバラバラに分解して当該分子を構成する各原子毎に原子化すると同時に、原子化した原子を1価のイオンにイオン化するものであり、このイオン化により生成された原子イオンを分析することにより、定量分析が可能となるものである。

従って、本発明のレーザーアブレーションを用いた生体試料の分析方法およびその装置によれば、例えば、核酸プローブをハイブリダイゼーションするまでの工程(約2時間程度の工程である。)は従来のin situハイブリダイゼーションと同じであるが、その後の発色や増感にかかる時間(約24時間程度)を必要とせず、そのまま分析器にかけることができるため、分析に要する時間を大幅に短縮することが可能となる。

また、本発明のレーザーアブレーションを用いた生体試料の分析方法およびその装置によれば、分析結果は、定量的なデータとして産出されるため、観察者によるバラツキがなく信頼性の高い結果を得ることが可能となる。

さらに、上記した従来の技術による手法では、同じ生体試料では一度に2～3種類の遺伝子しか測定することができないが、本発明のレーザーアブレーションを用いた生体試料の分析方法およびその装置によれば、標識として使用できる種類が非常に

多いため同一生体試料上で一度に多数の遺伝子などを測定することができ、これにより労力的ならびに時間的な効率を向上することができるようになるとともに、同一生体試料上で分析できるために、生体試料に由来するバックグラウンドの差が全く無い条件で複数遺伝子などの解析を行うことが可能となる。

また、本発明のレーザーアブレーションを用いた生体試料の分析方法およびその装置により質量分析を行う場合には、低質量の原子イオンを質量分析することになり、質量スペクトルの解析が困難になる恐れを排除することができるのみならず、高分解能を備えた質量分析器を用いる必要がなくなる。

また、本発明のレーザーアブレーションを用いた生体試料の分析方法およびその装置によれば、一種類の超短パルスレーザー光で生体試料をアブレーションすることにより、生体試料中の分子の原子化と同時に、原子化された原子の一価のイオンへのイオン化を効率良く行うことが可能となる。従って、レーザーの照射制御が簡潔になるとともに、例えば、化学分析に際して多種類の標識元素を同時に使用することが可能となるため、解析効率を著しく向上することができる。

つまり、本発明のレーザーアブレーションを用いた生体試料の分析方法およびその装置においては、標識元素の原子化とイオン化とを一種類の超短パルスレーザー光で同時に行うことができるため、分析作業を大幅に簡略化することが可能となり、従来と比較すると分析の効率を著しく向上することができるようになる。

さらに、上記したイオン化は、超短パルスレーザー光の高い尖頭値強度によって非共鳴過程によって行われるイオン化(非共鳴イオン化)であるので、多種類の標識同位体が混入した状況においても各標識原子をそれぞれイオン化することができ、多標識系への応用が容易であり、高精度かつ高効率な高分子の分析を行うことができるようになる。

[0007] 即ち、本発明は、分析の対象である生体試料に超短パルスレーザー光を照射してアブレーションすることにより、上記生体試料に含まれる分子を構成元素に原子化し、上記原子化した構成元素をイオン化し、上記イオン化した構成元素を分析することにより、上記生体試料中の分析を目的とする分子を分析するようにしたものである。

また、本発明は、上記生体試料中の分析を目的とする分子に対して特異的な結合

をする物質を直接的あるいは間接的に標識し、上記標識された物質が結合された分子を分析することにより、上記生体試料中の分析を目的とする分子を分析するようにしたものである。

また、本発明は、上記標識された特異的な結合をする物質が核酸であるようにしたものである。

また、本発明は、上記生体試料中の分析を目的とする分子が核酸であるようにしたものである。

また、本発明は、上記標識された特異的な結合をする物質である核酸は、DNA、RNA、PNA、その他修飾されたものを含むものである。

また、本発明は、上記核酸を分析するための標識された特異的な結合をする物質を、ハイブリダイゼーションによって結合するようにしたものである。

また、本発明は、上記核酸を分析するための標識された特異的な結合をする物質がアプタマーである。

また、本発明は、上記核酸を分析するための上記核酸の標識は、TUNEL法によるようにしたものである。

また、本発明は、上記生体試料中の分析を目的とする分子をタンパク質としたものである。

また、本発明は、上記タンパク質を分析するための標識された特異的な結合をする物質を、抗原抗体反応によって結合するようにしたものである。

また、本発明は、上記標識を元素標識としたものである。

また、本発明は、上記元素標識を安定同位元素標識としたものである。

また、本発明は、上記イオン化した構成元素の分析を質量分析としたものである。

また、本発明は、上記質量分析を飛行時間法による質量分析としたものである。

また、本発明は、標識として複数種の標識を用いることによりマルチチャンネル化し、分析の目的の分子として同一の生体試料中の少なくとも2種類以上の分子を分析するようにしたものである。

また、本発明は、上記生体試料を顕微鏡で観察して得られた組織像と、上記アブレーションしたスポットの位置とを対応させることにより、分析の目的とする分子の上記

生体試料内局在を分析するようにしたものである。

また、本発明は、上記超短パルスレーザー光は、パルス時間幅が1フェムト秒以上1ピコ秒以下であり、尖頭値出力が1メガワット以上10ギガワット以下であるようにしたものである。

また、本発明は、上記生体試料を生体組織切片またはと抹サンプルとしたものである。

また、本発明は、分析の対象である生体試料に照射して、該生体試料をアブレーションすることにより、上記生体試料に含まれる分子を構成元素に原子化し、上記原子化した構成元素をイオン化する超短パルスレーザー光を出射可能な超短パルスレーザー発生装置と、上記超短パルスレーザー発生装置から出射された超短パルスレーザー光によってイオン化された構成元素を導入して分析する分析器と、上記分析の対象である生体試料の形状を観察するための顕微鏡装置とを有するようにしたものである。

また、本発明は、上記顕微鏡装置を正立顕微鏡装置とし、上記正立顕微鏡装置の対物レンズを上記生体試料の上面に配置するとともに、上記超短パルスレーザー発生装置からの超短パルスレーザー光の照射を上記生体試料の下面から行うようにしたものである。

また、本発明は、上記顕微鏡装置を正立顕微鏡装置とし、上記正立顕微鏡装置の対物レンズを上記生体試料の上面に配置するとともに、上記超短パルスレーザー発生装置からの超短パルスレーザー光の照射を上記生体試料の上面から行うようにしたものである。

また、本発明は、上記顕微鏡装置を倒立顕微鏡装置とし、上記倒立顕微鏡装置の対物レンズを上記生体試料の下面に配置するとともに、上記超短パルスレーザー発生装置からの超短パルスレーザー光の照射を上記生体試料の上面から行うようにしたものである。

また、本発明は、上記顕微鏡装置を倒立顕微鏡装置とし、上記倒立顕微鏡装置の対物レンズを上記生体試料の下面に配置するとともに、上記超短パルスレーザー発生装置からの超短パルスレーザー光の照射を上記生体試料の下面から行うようにし

たものである。

また、本発明は、上記超短パルスレーザー発生装置を、パルス時間幅が1フェムト秒以上1ピコ秒以下であり、尖頭値出力が1メガワット以上10ギガワット以下である超短パルスレーザー光を出射するようにしたものである。

また、本発明は、さらに、上記顕微鏡装置により観察された画像を解析する画像解析装置とを有するようにしたものである。

また、本発明は、上記生体試料を生体組織切片またはと抹サンプルとしたものである。

[0008] ここで、本発明において超短パルスレーザー光により生体試料をアブレーションする際には、生体試料に超短パルスレーザー光を1ショット(1パルス)照射すれば十分である。しかしながら、生体試料に超短パルスレーザー光を複数ショット(複数パルス)照射してもよく、生体試料へ照射する超短パルスレーザー光のショット数(パルス数)は適宜に選択すればよい。

また、超短パルスレーザー光とは、パルス時間幅が10ピコ秒以下であることが好ましく、例えば、パルス時間幅が1フェムト秒以上1ピコ秒以下の通常はフェムト秒レーザーと称されるレーザーから照射されるフェムト秒レーザー光を用いるのが適当である。

また、超短パルスレーザー光の尖頭値出力としては、1メガワット以上が好ましく、さらに詳細には、1メガワット以上10ギガワット以下が好ましい。

その理由は、超短パルスレーザー光の尖頭値出力が10ギガワットより大きいと、多価イオンが生成されて質量スペクトルの解析が困難となる恐れがあり、超短パルスレーザー光の尖頭値出力が1メガワットより小さいと、原子化・イオン化の効率が低下して原子イオン信号を観測することが困難となる恐れがあるからである。

なお、後述する本願発明者による実験によれば、例えば、パルス時間幅が100フェムト秒、レーザーパワー0.2mJの場合には、極めて良好な結果を得ることができた。

[0009] また、本発明によれば、原子化と同時にイオン化を効率良く行うことのできるフェムト秒レーザー光などの超短パルスレーザー光を、同位元素などで標識した核酸に照射するようにしている。このため、標識元素を選択的にイオン化する必要が無くなり、種

々様々な標識元素を使用することが可能となる。その上、レーザー照射の繰り返しレートを数kHzまで上げることが可能であるため、高速解析に適している。

- [0010] また、本発明では、生体試料中の分子をアブレーションする超短パルスレーザー光と当該分析の対象である生体試料とは、少なくともいずれか一方を移動させることにより、当該短パルスレーザー光により当該分析の対象である生体試料を遺漏、重複なくアブレーションして分析を行うようにしている。即ち、本発明においては、例えば、超短パルスレーザー光のスポットと試料として分析の対象である生体試料との相対的な移動により、広い面積にわたって生体試料を遺漏・重複することなくアブレーションすることを可能にしている。

本発明によれば、これらの特徴から、解析速度が従来と比較して格段に早くなる。

- [0011] また、本発明によれば、標識として元素標識を用いることが可能となる。さらに詳細には元素標識として、多種類の同位元素を用いることが可能となり、元素標識として、例えば、安定同位元素を用いれば、標識の種類は多種類の安定同位体の数(270種類)にも増やすことができる。これは、従来の標識法である蛍光法(2~6種類)や放射性同位元素(約10種類)と比較して、飛躍的に情報量を増やすことができることを意味している。

より詳細には、生体試料中の分析を目的とする分子の標識として、例えば、周期律表において1族の安定同位体である³⁹K、⁴¹Kなど、周期律表において16族の安定同位体である³²S、³⁵Sなど、周期律表において17族の安定同位体である³⁵Cl、³⁷Clなど、周期律表において遷移金属の安定同位体である¹¹⁸Sn、¹²⁰Snなど、さらには、周期律表において8族Fe、周期律表において12族Hg、周期律表において15族I、Eu、Tb、SmおよびDyなどのランタノイドの安定同位元素で使うことが可能となる。

ここで、現在利用されている標識と比較すると例えば、安定同位元素を使えば、標識の種類を270種にも増やすことができる。

さらに、標識として複数種の標識を用いることによりマルチチャンネル化すると、分析の目的の分子として同一の生体試料中の少なくとも2種類以上の分子を分析することができる。

このように、本発明によって、多種類の安定同位元素標識による高感度・高速質量

分析法を確立することができるものであり、従って、本発明は、蛍光色素や放射性同位元素で標識を行っている全ての研究分野へ応用可能である。

また、本発明によれば、標識元素に放射性同位元素を用いることなく、安定同位元素を用いることができるので、その場合には使用される施設に制限を受けないため、医療施設や民間企業への設置も可能となる。

発明の効果

[0012] 本発明は、従来技術と比較すると、分析に要する時間を大幅に短縮化することができるという優れた効果を奏する。

また、本発明は、観察者により分析結果が左右されることのない、信頼性の高い結果を得ることができるという優れた効果を奏する。

また、本発明は、同一の生体試料上で一度に多数の遺伝子などを分析することができ、作業労力的ならびに時間的な効率を向上することができるとともに、生体試料に由来するバックグラウンドの差が全く無い条件で複数の遺伝子などの解析を行うことができるという優れた効果を奏する。

また、本発明は、生体試料中の分子の質量分析を行う場合に、質量スペクトルの解析が困難になる恐れを排除することができ、質量分析器に高分解能を必要とすることがないという優れた効果を奏する。

また、本発明は、生体試料中の分子を構成する構成原子の原子化とイオン化とを1台のレーザー源で同時に実現することが可能となり、システム構成ならびにレーザーの照射制御を大幅に簡潔にすることができるという優れた効果を奏する。

また、本発明は、多種類の標識同位体が混入した状況においても、効率の良い分析を行うことができるという優れた効果を奏する。

図面の簡単な説明

[0013] [図1]図1は、本発明によるレーザーアブレーションを用いた生体組織切片の分析装置の一例の概念構成説明図であり、生体組織切片中の分子の質量分析を行う質量分析システムとして構成した本発明によるレーザーアブレーションを用いた生体組織切片の分析装置の概念構成説明図である。

[図2]図2は、TAS増感法による標識遺伝子の染色によるin situハイブリダイゼーション

ヨンの原理の説明図である。

[図3]図3は、同時多数プローブを用いたハイブリダイゼーションの原理の説明図である。

[図4]図4は、単一プローブ増感法によるin situハイブリダイゼーションの原理の説明図である。

[図5]図5は、実験に用いた生体組織切片を顕微鏡で観察した状態を示す説明図である。

[図6]図6は、領域1に超短パルスレーザー光を照射した際の質量スペクトルを示すグラフである。

[図7]図7は、領域2に超短パルスレーザー光を照射した際の質量スペクトルを示すグラフである。

[図8]図8は、領域3に超短パルスレーザー光を照射した際の質量スペクトルを示すグラフである。

[図9]図9は、領域4に超短パルスレーザー光を照射した際の質量スペクトルを示すグラフである。

[図10]図10は、図6～9に示す質量スペクトルからそれぞれの標識原子に由来するピークに基づいて標識原子量を算出したものを示す図表である。

[図11]図11は、領域1における顕微鏡で観察した状態を示す説明図上に、図10に示す領域1における遺伝子の強度の高い領域を破線で囲んで示した説明図である。

[図12]図12は、領域2における顕微鏡で観察した状態を示す説明図上に、図10に示す領域2における遺伝子の強度の高い領域を破線で囲んで示した説明図である。

[図13]図13は、領域3における顕微鏡で観察した状態を示す説明図上に、図10に示す領域3における遺伝子の強度の高い領域を破線で囲んで示した説明図である。

[図14]図14は、領域4における顕微鏡で観察した状態を示す説明図上に、図10に示す領域4における遺伝子の強度の高い領域を破線で囲んで示した説明図である。

[図15]図15は、実施例2について、発現している遺伝子をアンチセンスプローブとネガティブコントロールのセンスプローブを用いて検出した組織を示す説明図と、レーザーを照射して得られたスペクトルを示すグラフおよび比較のために隣接した断面で

の同遺伝子の発現を定法のニトロブルーテトラゾリウム(NBT)で発色させた結果を示す説明図である。

符号の説明

[0014]	10	分析装置
	12	真空槽
	14	ターゲット
	16	飛行時間型質量分析器(TOF質量分析器)
	18	回転導入端子
	20	超短パルスレーザー発生装置
	22	顕微鏡装置
	24	画像解析装置

発明を実施するための最良の形態

[0015] 以下、添付の図面を参照しながら、本発明によるレーザーアブレーションを用いた生体試料の分析方法およびその装置の実施の形態の一例を詳細に説明するものとする。

本発明によるレーザーアブレーションを用いた生体試料の分析方法およびその装置によれば、生体試料中の分子を分析することができるものであり、以下の説明においては、分析の対象の生体試料として、生体組織切片を用いた場合について説明する。

なお、本発明によるレーザーアブレーションを用いた生体試料の分析方法およびその装置において分析の対象となる生体試料としては、生体組織切片の他に、例えば、血液、唾液、喀痰、尿などのと抹サンプル、培養細胞あるいは感染症検査などがある。

[0016] 図1には、本発明によるレーザーアブレーションを用いた生体試料の分析装置の実施の形態の一例として、生体組織切片中の分子の質量分析を行う質量分析システムとして構成した本発明によるレーザーアブレーションを用いた生体試料の分析装置(以下、単に「分析装置」と適宜に称する。)の概念構成説明図が示されている。

[0017] この分析装置10は、例えば $10^{-8} \sim 10^{-6}$ Torrの真空度に設定可能な真空槽12と

、この真空槽12内に配置された分析対象の生体組織切片である試料のターゲット14と、真空槽12内に配置された質量分析器としての飛行時間型質量分析器(TOF質量分析器)16と、ターゲット14を回転する回転導入端子18と、例えばフェムト秒レーザー光などの超短パルスレーザー光を出射してターゲット14へ照射する超短パルスレーザー発生装置20と、ターゲット14を観察するための顕微鏡装置22と、顕微鏡装置22で観察したターゲット14の像を解析するとともにその解析結果を表示する表示部24aを備えた画像解析装置24とを有している。

なお、超短パルスレーザー発生装置20から照射された超短パルスレーザー光は、フォーカスレンズ(図示せず。)やミラー(図示せず。)などの光学系を介して、ターゲット14上へ集光される。

[0018] ここで、詳細な図示は省略するが、顕微鏡装置22は、正立型の顕微鏡(正立顕微鏡)装置でも倒立型の顕微鏡(倒立顕微鏡)装置でもよい。

また、顕微鏡装置22による観察と超短パルスレーザー発生装置20による超短パルスレーザー光の照射とは、両者をターゲット14の同一面から行ってよいし、互いに異なる面から行ってもよい。即ち、ターゲット14の一方の面に超短パルスレーザー発生装置20から超短パルスレーザー光を照射するとともに、当該一方の面から顕微鏡装置22によりターゲット14の状態を観察するようにしてもよいし、また、ターゲット14の一方の面に超短パルスレーザー発生装置20から超短パルスレーザー光を照射するとともに、当該一方の面とは異なる他方の面から顕微鏡装置22によりターゲット14の状態を観察するようにしてもよいものであり、超短パルスレーザー発生装置20による超短パルスレーザー光の照射によるターゲット14の変化の状態をin situでリアルタイムに観察することができる。

具体的には、顕微鏡装置22として正立顕微鏡装置を用いた場合には、正立顕微鏡装置の対物レンズをターゲット14の上面に配置するとともに、超短パルスレーザー発生装置20からの超短パルスレーザー光の照射をターゲット14の下面から行うようにすることができる。

同様に、顕微鏡装置22として正立顕微鏡装置を用いた場合に、正立顕微鏡装置の対物レンズをターゲット14の上面に配置するとともに、超短パルスレーザー発生装

置20からの超短パルスレーザー光の照射もターゲット14の上面から行うようにしてもよい。さらに、この場合においては、正立顕微鏡装置の対物レンズを通して超短パルスレーザー光の照射が行われるようにしてもよい。

一方、顕微鏡装置22として倒立顕微鏡装置を用いた場合には、倒立顕微鏡装置の対物レンズをターゲット14の下面に配置するとともに、超短パルスレーザー発生装置20からの超短パルスレーザー光の照射をターゲット14の上面から行うようにすることができる。

同様に、顕微鏡装置22として倒立顕微鏡装置を用いた場合に、倒立顕微鏡装置の対物レンズをターゲット14の下面に配置するとともに、超短パルスレーザー発生装置20からの超短パルスレーザー光の照射もターゲット14の下面から行うようにしてもよい。さらに、この場合においては、倒立顕微鏡装置の対物レンズを通して超短パルスレーザー光の照射が行われるようにしてもよい。

即ち、ターゲット14の一方の面に超短パルスレーザー発生装置20から超短パルスレーザー光を照射するとともに、当該一方の面から顕微鏡装置22によりターゲット14の状態を観察する場合には、顕微鏡装置22の対物レンズを通して超短パルスレーザー光の照射が行われるように配置してもよい。

[0019] また、超短パルスレーザー発生装置20としては、フェムト秒レーザーなどのような、例えば、パルス時間幅が1フェムト秒以上1ピコ秒以下であり、尖頭値出力が1メガワット以上10ギガワット以下である超短パルスレーザー光を照射可能なものを用いることができる。

より詳細には、こうした超短パルスレーザー発生装置20は、例えば、チタンサファイアレーザーにより構成され、以下に示すようなパラメータを備えているものを用いることができる。即ち、

ピーク幅 (パルス時間幅) :	~110fs (フェムト秒)
出力	: 50~480 μ J (マイクロジュール)
(尖頭値出力 :	0.5~4GW (ギガワット))
波長	: ~800nm (ナノメートル)
繰り返し	: 1kHz (キロヘルツ)

である。

また、質量分析器としては、飛行時間型質量分析器に代えて、四重極質量分析器などの各種の質量分析器を用いるようにしてもよいことは勿論である。

また、超短パルスレーザー発生装置20から出射された超短パルスレーザー光を集光するフォーカスレンズの焦点距離は、例えば、25cmに設定されている。

[0020] 以上の構成において、上記した分析装置10を用いて生体組織切片中の分子の質量分析を行う手法について説明する。

ここで、本発明による生体組織切片中の分子の質量分析は、フェムト秒レーザーなどの超短パルスレーザー発生装置20から出射された超短パルスレーザー光によるアブレーションと、飛行時間型質量分析器16による分析とを用いて、生体組織切片中の分子の質量分析を行うものである。

即ち、本発明による生体組織切片中の分子の質量分析は、分析の対象である生体組織切片に超短パルスレーザー光を照射して当該生体組織切片をアブレーションすることにより、生体組織切片に含まれる分子を構成元素に原子化し、原子化した構成元素をイオン化し、イオン化した構成元素を分析するものである。

具体的には、生体組織切片をターゲット14として真空槽12内に配置し、ターゲット14たる生体組織切片に超短パルスレーザー発生装置20から出射されたフェムト秒レーザー光などの超短パルスレーザー光を照射してアブレーションを行い、飛行時間型質量分析器16により分析するものである。

この際に、分析の対象となる生体組織切片中の分子に元素標識などにより標識を付しておくようにすると、標識を付した分子を含む生体組織切片をターゲット14として真空槽12内に配置し、ターゲット14たる生体組織切片に超短パルスレーザー発生装置20から出射されたフェムト秒レーザー光などの超短パルスレーザー光を照射してアブレーションを行って、飛行時間型質量分析器16により標識元素を測定することにより、分析対象となる生体組織切片中の分子を検出して分析することができる。

[0021] ここで、超短パルスレーザー発生装置20から出射されたフェムト秒レーザー光などの超短パルスレーザー光の照射位置は、あらかじめ生体組織切片たるターゲット14を顕微鏡装置22で観察して決定することができる。

さらに、顕微鏡装置22により得られた生体組織切片たるターゲット14上におけるレーザー照射を行った各点での画像を、画像解析装置24により解析して、画像解析装置24の表示部24aにおいて当該各点での標識元素の強度を色彩表示に変換した形でターゲット14たる生体組織切片画像上に表示し、生体組織切片の形態的特徴と計測結果を同時に視認することができるような処理を施すことにより、従来のin situハイブリダイゼーション法と同様の形式でデータを解析することが可能となる。

また、超短パルスレーザー光によるアブレーションを行う分析装置10にターゲット14として生体組織切片をセットする前に、あらかじめ生体組織切片を顕微鏡装置22で観察し、生体組織切片に基準点を設け、これを基準としてレーザー照射位置の位置決めを行うことによって、顕微鏡装置22による観察画像と超短パルスレーザー光を用いたアブレーションにより計測した分子分析結果とを対応させることもできる。

[0022] なお、本発明においては、同位体元素で標識した分子それ自体を原子レベルでイオン化し、標識元素を検出することが可能となるから、質量分析可能な対象範囲を飛躍的に広げることができるようになる。例えば、標識として同位体元素を用いることが可能となり、標識の種類をたとえば安定同位体元素の数である270にも増やすことができる。これは、従来の標識法である蛍光法(2種類)や放射性同位元素(約10種類)と比較して、飛躍的に情報量を増やすことができる。

実施例 1

[0023] 以下、生体試料の作製の一例として、マウス脳をスライスして形成した生体組織切片の作製の手法について説明する。

[0024] 1. マウス脳の調製

動物:モデル動物として、オリエンタル酵母株式会社から購入した雄の10～11週齢の野生型CD-1マウスおよびC57BL/6Jを用いた。

こうしたマウスの脳の調製する際の試薬としての固定液は、以下の表1に示す通りである。

[表1]

試薬：固定液	
・ <u>中性固定液：1L 4% PFA (パラフォルムアルデヒド) 液 (pH7.5)</u>	
PFA	40g
蔗糖	40g
Na ₂ HPO ₄ ・12H ₂ O	11.4g
NaH ₂ PO ₄ ・2H ₂ O	3.3g
・ <u>酸性固定液：Original-Bouin 液 (pH3.5～4.0)</u>	
飽和ピクリン酸	300ml
ホルマリン	100ml
酢酸	20ml

上記試薬を用いて、下記のような方法により、生体組織切片としてマウス脳のパラフィン切片ならびに凍結切片を作製した。

<方法>

1) パラフィン切片の作製

マウスにエーテル麻酔し、痛覚反応がなくなった後、開腹し心臓を露出させ、氷冷した中性固定液、酸性固定液を20mlずつ順に心臓から流入させ灌流固定を行った。その後、脳を摘出し、酸性固定液中において4℃で3日間放置して固定した。

固定した組織を薄切して切片を作製し、スライドグラスに貼付した。VENTANA社製自動in situ hybridization (in situハイブリダイゼーション) 装置を用いてパラフィン切片を作製した。

2) 凍結切片の作製

エーテル麻酔下で脊椎脱臼後に脳を摘出し、OCTに包埋し液体窒素で凍結し、ライカ社製薄切機で切片を作成した。

目的遺伝子のcDNA配列を理研FANTOMクローンから検索した。さらに、公共データベースのLocusLinkよりcDNAを参照して、目的となるcDNA配列を選択した。選択した塩基配列をアミノ酸配列に変換し、NCBI Protein BLASTでホモロジー検索した。ホモロジーの低い配列に相当するcDNA部分を同定し、鋳型として増幅させるためにプライマーを設計した。さらに、必要に応じて、ゲノムDNAからホモロジーの低い配列を鋳型として増幅させるためにプライマーを設計した。なお、遺伝子のLocusLink IDを表2に示す。

[表2]

遺伝子名	Locus Link ID
Tph2	NM_173391
MaoB	NM_172778
AADC	NM_016672
Htr1B	NM_010482

[0026] 3. プラズミッドの精製

機器として株式会社島津製作所製の分光光度計 (Bio Spec-1600) およびApplied Biosystems社製のGeneAmp PCR System 9700を用い、試薬として表3に示すものを用いて、以下の方法によりプラズミッドの精製を行った。

[表3]

試薬
<ul style="list-style-type: none">• QIAprep Spin Miniprep Kit : QIAGEN• TaKaRa Ex Taq (商標) : TaKaRa• MicroSpin (商標) Column : Amersham Pharmacia Biotech• MinElute Gel Extraction Kit : QIAGEN• DIG RNA Labeling Kit (SP6/T7) : Roche Diagnostics• SP6/T7 Transcription Kit : Roche Diagnostics• BD CHROMA SPIN Column : Clontech

<方法>

大腸菌からQIAprep Spin Miniprep Kitを用いて、添付のプロトコールに従い、プラスミドDNAを精製し、分光光度計で吸光度を測定して、濃度を算出した。プラスミドDNAを鋳型として設計したプライマーを用いて、PCRを行った。反応液組成、反応条件は以下に示す。反応産物を2%のアガロースゲルに電気泳動し、確認した。

[0027] 4. プローブの作製

1) 安定同位体標識ssDNAプローブの作製

表4に示す反応液および反応条件により、安定同位体標識ssDNAプローブを作製した。標識dNTPには、パーキンエルマー社製のEu標識dUTP、Sm標識dUTP、Tb標識dUTPおよびDy標識dUPTを用いた。

[表4]

反応液組成		
		μl
プラスミド DNA (1ng/ μl)		0.5
Fプライマー (25 μM)		1.0
10 × Buffer		5.0
標識dNTP		1.0
dNTP Mixture		4.0
TaKaRa Ex Taq (商標) (5unit/ μl)		0.5
滅菌水		34.0
		50.0
反応条件		
95℃	5分	
95℃	1分	
60℃	1分	30サイクル
72℃	1分	
72℃	3分	
4℃	∞	

PCR産物をフェノール・クロロホルム抽出して、MicroSpin (商標) カラムにより精製した。その精製産物をアガロースゲル上で確認した。

2) DIG標識RNAプローブの作製

表5に示す反応液および反応条件により、DIG標識RNAプローブを作製した。

[表5]

反応液組成		
		μl
プラスミド DNA (1ng/ μl)		0.5
Fプライマー (25 μM)		1.0
Rプライマー (25 μM)		1.0
10 \times Buffer		5.0
dNTP Mixture		4.0
TaKaRa Ex Taq (商標) (5unit/ μl)		0.5
滅菌水		34.0
		50.0
反応条件		
95℃	5分	
95℃	1分	
60℃	1分	30サイクル
72℃	1分	
72℃	3分	
4℃	∞	

このPCR産物とT7とSP6ポリメラーゼの認識配列(*T7, SP6 adaptor)を含むプ

ライマーを用い、再びPCRを行った。反応液組成、反応条件は表6に示す。反応産物を2%のアガロースゲルに電気泳動し、確認した。

*T7 adaptor:GAGCGCGCGTAATACGACTCACTATAGGGC

SP6 adaptor:TTGTGCGGCCATTTAGGTGACACTATAGAA

[表6]

反応液組成		
		μl
1st PCRプロダクト		0.5
SP6 アダプター (10 μM)		2.5
T7 アダプター (10 μM)		2.5
10 \times Buffer		5.0
dNTP Mixture		4.0
TaKaRa Ex Taq (商標) (5unit/ μl)		0.5
滅菌水		34.0
		50.0
反応条件		
95°C	5分	
95°C	1分	
60°C	1分	25サイクル
72°C	1分	
72°C	3分	
4°C	∞	

PCR産物をフェノール・クロロホルム抽出して、MicroSpin (商標) カラムにより精製した。

次に、DIG標識RNAアンチセンスプローブおよびセンスプローブの作製について

説明する。

即ち、アンチセンスプローブを作製時にT7ポリメラーゼ、センスプローブ作製時にはSP6ポリメラーゼを用い、表7に示す反応液組成で37℃で2時間インキュベートした。反応産物を1%のアガロースゲルに電気泳動し、確認した。

[表7]

反応液組成	
	μl
PCR 産物	10.0
10 × Transcription buffer	2.0
NTP labeling mixture	2.0
RNase インヒビター (40U/ μl)	0.5
T7 or SP6 ポリメラーゼ (20U/ μl)	2.0
滅菌水	3.5
	20.0

確認後、DNAを除去するためDNaseI (10U/ μl)を2 μl 加え、37℃で30分間インキュベートした。DNAが除去したかどうかを1%のアガロースゲルに電気泳動し、確認した。除去できていたら0.2M EDTA を2 μl 加え反応を停止させ、BD CHROMA SPIN Columnでプローブを精製した。

[0028] 5. ドット・ブロット法によるプローブの定量

プローブ作製の結果、得られた標識DNAを正確に定量することは、ISHの結果を最適化し、再現性を持たせるのにきわめて重要である。そこで、既知量のスタンダー

ドを希釈したものと実際にラベルした未知量のプローブの希釈系列と検体の希釈列とを並列にスポットし、レーザー照射法および抗DIG抗体を用いた発色法で検討した。

以下、DIG標識プローブの定量について説明する。まず、使用する機器ならびに試薬について説明するものとする。

機器として振とう機、UVクロスリンカーおよびナイロンメンブレン (Amersham Pharmacia Biotech Hybond-N)を用い、試薬として表8に示すものを用いて、以下の方法によりDIG標識プローブの定量を行った。

[表8]

試薬
<ul style="list-style-type: none">・ コントロール DIG-label DNA : Roche Diagnostics・ TBSバッファー<ul style="list-style-type: none">0.5M Tris-Cl(PH7.4)1.5MNaCl・ ブロッキング試薬<ul style="list-style-type: none">TBS-T(TBS,0.1%Tween20)5%スキムミルク・ APB バッファー(4℃)<ul style="list-style-type: none">100mM Tris-Cl(pH9.5)50mM MgCl₂100mM NaCl・ Anti-DIG-AP:Roche Diagnostics、 Lot1 093 274・ NBT/BCIP 溶液<ul style="list-style-type: none">(ニトロブルーテトラゾリウム/ブロモクロロインドリルリン酸)

<方法>

96穴プレートにコントロールRNAと作製したプローブの希釈系列を作り、各穴の希釈溶液を1ulずつナイロンメンブレン上にスポットした。メンブレンを風乾させた後、UVクロスリンカーで処理(120mJ/cm²)した。Blocking Reagentを加えた溶液にメンブレンを浸し、振とう機で10分間振とうさせた後、抗体反応を行うため、Anti-DIG-AP5000倍希釈液で30分間振とうさせた。TBSバッファーでメンブレンを洗浄した後、NBT/BCIP溶液を加え振とうさせ発色反応を行った。十分発色させた後、MilliQ水を加え10分間振とうさせ発色反応を止めた。そして、流水で水洗し、風乾した後、ハイブリパックで密封し、コントロールRNAと作製したプローブのスポットシグナルを比較してプローブの定量を行った。

[0029] 6. in situハイブリダイゼーション法

1) マーカー遺伝子のハイブリダイゼーション

図2に示すように、プローブにDIG標識RNAプローブを用いて、アルカリフォスファターゼによる発色をVENTANA社製自動ISH装置で行った。

2) 同時多数プローブを用いたハイブリダイゼーション

図3に示すように、プローブに同位体元素Eu, Sm, Tb, Dyを標識し、自動ISH装置で前処理を行った後、SAW agitation法(Advalytix)を用いて短時間でハイブリダイゼーションを行った。

Map2 マーカー遺伝子 DIG標識

Tph2 目的遺伝子1 Sm標識 NM__173391

MaoB 目的遺伝子2 Eu標識 NM__172778

AADC 目的遺伝子3 Dy標識 NM__016672

Htr1B 目的遺伝子4 Tb標識 NM__010482

3) 高感度ハイブリダイゼーション

図4に示すように、プローブにDIG標識RNAプローブを用いて、チラミド増感法とAvidin化Euを併用した増感法を用いて高感度ハイブリダイゼーションを行った。

[0030] 以下、生体試料として生体組織切片を用い、この生体組織切片に超短パルスレーザー光を照射してアブレーションし、生体組織切片を分析した結果について説明す

る。

即ち、上記1～4において説明した手法によって得られたマウス脳の生体組織切片をターゲット14として用いて、分析装置10により分析を行った実験結果は、以下に示す通りである。

この実験は、上記のようにして作製した生体組織切片をターゲット14として超短パルスレーザー発生装置20からのフェムト秒レーザー光などの超短パルスレーザー光を照射してアブレーションを行い、飛行時間型質量分析器16により分析するものである。

より詳細には、上記のようにして作製したターゲット14を真空槽12内に装着して、真空槽12内を真空に引いて、真空槽12内の真空度が 10^{-6} Torr以下となるように設定する。

次に、超短パルスレーザー発生装置20から出射された超短パルスレーザー光を、フォーカスレンズなどの光学系を用いてターゲット14上に集光して、ターゲット14上に設定された領域をアブレーションする。

そして、飛行時間型質量分析器16によって、ターゲット14への超短パルスレーザー光の照射により発生した一価のイオンの質量を測定する。

[0031] ここで、図5は実験に用いた生体組織切片を顕微鏡装置22により観察した状態を示す説明図であり、マーカー遺伝子の局在をTSA増感ISH法を用いて示した。このプローブを用いると神経細胞を選択的に染色することが可能で、そのシグナルはレーザー照射の際のマーカーとなる。

このマーカー遺伝子の位置を基点として、図5において四角形で囲んだ領域1～4を設定し、超短パルスレーザー発生装置20により超短パルスレーザー光の照射を行った。

その超短パルスレーザー光の照射する際の条件は、

パルス幅: 100fs (フェムト秒)

レーザーパワー: 0. 2mJ (ミリジュール)

である。

上記照射条件により超短パルスレーザー光を領域1～4にそれぞれ照射し、超短パ

ルスレーザー光の照射によって発生されたイオンを飛行時間型質量分析器16により測定して、それぞれの領域における標識元素を測定したところ、図6～9に示す質量スペクトルが得られた。

即ち、上記した領域1に超短パルスレーザー光を照射した際の質量スペクトルが図6に示され、領域2に超短パルスレーザー光を照射した際の質量スペクトルが図7に示され、領域3に超短パルスレーザー光を照射した際の質量スペクトルが図8に示され、領域4に超短パルスレーザー光を照射した際の質量スペクトルが図9に示されている。

上記した図6～9に示す質量スペクトルから、それぞれの標識原子に由来するピークに基づいて標識原子量を算出したものが、図10として示す図表にまとめられている。

この図10に示すように、生体組織切片にフェムト秒レーザー光などの超短パルスレーザー光を照射し、標識原子を計測することにより、生体組織切片中の遺伝子の発現を解析することができた。

また、図11～14には、顕微鏡装置22および画像解析装置24を用いて、領域1～4におけるそれぞれ顕微鏡で観察した状態を示す説明図上に、図10に示す領域1～4における遺伝子の強度の高い領域を破線で囲んで示している。なお、画像としてカラー画像を扱うようにすれば、強度分布をより詳細に示すことが可能となる。

これら図11～14に示すように、分析装置10によれば、顕微鏡装置22により得られた生体組織切片たるターゲット14上におけるレーザー照射を行った領域1～4での画像を、画像解析装置24により解析して、画像解析装置24の表示部24aにおいて領域1～4での標識元素の強度を枠線表示や色彩表示に変換した形で領域1～4の切片画像上に表示し、生体組織切片の形態的特徴と計測結果を同時に視認することができるようになる。

なお、この実施例においては、各領域毎に各遺伝子に関する画像、即ち、領域1～4の各領域に対して遺伝子1～4についての4枚の画像を得るようにしたが、これに限られるものではないことは勿論であり、カラー画像を用いて遺伝子の色を変えることにより、各領域毎の画像に複数の遺伝子の発現を示すことができるようによい

。

実施例 2

[0032] 次に、PtラベルRNAプローブを用いた検出について説明する。

樹状突起に多く存在する微小管関連タンパク質MAP2の遺伝子について、マウス脳における発現を調べた。

なお、マウスの脳の調整、プライマーの設計、プラスミドの精製については、「実施例1」と同様の方法で行なった。

[0033] 1. プローブの作製

1) PtラベルRNAプローブの作製

表5に示す反応液および反応条件により、鋳型DNAを作成した。また、RNAプローブを作製した。

このPCR産物とT7とSP6ポリメラーゼの認識配列(*T7, SP6 adaptor)を含むプライマーを用い、再びPCRを行った。反応液組成、反応条件は表6の通りである。反応産物を2%のアガロースゲルに電気泳動し、確認した。

*T7 adaptor: GAGCGCGCGTAATACGACTCACTATAGGGC

SP6 adaptor: TTGTGCGGCCATTTAGGTGACACTATAGAA

PCR産物をフェノール・クロロホルム抽出して、MicroSpin(商標)カラムにより精製した。

次に、アンチセンスプローブを作製時にT7ポリメラーゼ、センスプローブ作製時にはSP6ポリメラーゼを用い、表9に示す反応液組成で37℃で2時間インキュベートした。反応産物を1%のアガロースゲルに電気泳動し、確認した。

[表9]

反応液組成	
	μl
PCR 産物	10.0
10 × Transcription buffer	2.0
NTP mixture	2.0
RNase インヒビター (40U/ μl)	0.5
T7 or SP6 ポリメラーゼ (20U/ μl)	2.0
滅菌水	3.5
	20.0

確認後、DNAを除去するためDNaseI (10U/ μl)を2 μl 加え、37℃で30分間インキュベートした。DNAが除去したかどうかを1%のアガロースゲルに電気泳動し、確認した。除去できていたら0.2M EDTAを2 μl 加え反応を停止させ、BD CHROMA SPIN Columnでプローブを精製した。

精製したRNAを、ULYSIS Nucleic Acid Labeling Kit (Molecular Probe社製)を用いてラベルした。精製したRNA1 μg に10分の1量の3M NaAcO (pH 5.2)と2倍量のエタノールを加え、−70℃に30分間静置した後、12000rpm、4℃で15分間遠心した。

ペレットを70%エタノールで洗い、風乾した後、labeling buffer (Component C) 20 μl に溶かした。これを95℃で5分間インキュベートし、その後氷上に置いた。スピンドウンして、水滴をチューブの底に集め、ULS labeling reagent (Alexa Fluor 532)を5 μl 加え、labeling buffer (Component C)を足して総量を25 μl に

した。90℃で10分間インキュベートした後、氷上に置き反応を止め、スピンドウンして、水滴をチューブの底に集めた。ラベルしたサンプルにTE 100 μ lを加え、MicroSpin S-400を用いて精製し、PtラベルRNAプローブとした。

[0034] 2. in situハイブリダイゼーション

実施例1と同様に、VENTANA社製自動in situ hybridization(in situハイブリダイゼーション)装置を用いて、ハイブリダイゼーション反応を行なった。

in situハイブリダイゼーションには、RNAプローブを20 μ lを用いた。

[0035] 3. 飛行時間型質量分析器を用いたPtラベルの検出

実施例1と同様の方法で、分析装置10により分析を行なった結果を図15に示す。図15には、発現している遺伝子を上記で作製したアンチセンスプローブとネガティブコントロールのセンスプローブを用いて検出した組織を示す説明図と、レーザーを照射して得られたスペクトルおよび比較のために隣接した断面での同遺伝子の発現を定法のニトロブルーテトラゾリウム(NBT)で発色させた結果が示されている。

Ptラベルアンチセンスプローブを用いた場合には、Ptに由来するピーク(質量数194、195、196)が観察されるのに対し、ネガティブコントロールでは、Ptのピークは検出されなかった。

これは、比較のために示した従来の染色法による結果と良く一致しており、Ptラベルアンチセンスプローブを用いた解析が遺伝子の発現解析に有用であることが判った。

[0036] [変形例]

なお、上記した実施の形態は、以下の(1)乃至(12)に示すように変形することができるものである。

(1) 上記した実施の形態においては、質量分析器として、原子の飛行時間を測定することにより質量分析を行う飛行時間型質量分析器を用いたが、飛行時間型質量分析器を用いた場合には、一回のレーザー照射で複数の原子の質量分析を同時に行うことができる。また、質量分析器としてイオンサイクロトロン型フーリエ変換質量分析器を用いた場合にも、複数の原子の質量分析を同時に行うことが可能となる。

(2) 上記した実施の形態においては、分子の分析方法として質量分析に関して説明

したが、これに限られるものではないことは勿論であり、質量分析以外の分析に関して本発明を用いるようにしてもよい。

(3) 上記した実施の形態においては、ターゲット14を移動する移動手段として、ターゲット14を回転する回転導入端子18を用いたが、これに限られるものではないことは勿論であり、ターゲット14を載置可能な移動自在のテーブルなどの適宜の移動手段を用いるようにしてもよい。

(4) 上記した実施の形態においては、回転導入端子18を用いてターゲット14を回転することにより、ターゲット14を遺漏・重複なくアブレーションするようにしたが、これに限られるものではないことは勿論であり、超短パルスレーザー光のターゲットへの照射位置を移動する移動手段を設けるようにして、ターゲット14を遺漏・重複なくアブレーションするようにしてもよい。

(5) 上記した実施の形態においては、核酸プローブが特定のターゲットに結合する例としてハイブリターゼーションを示したが、これに限られるものではないことは勿論であり、ハイブリターゼーション以外にアプタマーのような結合をしてもよい。

(6) 本発明においては、分析の対象とする目的の核酸を検出するための核酸の標識を、TUNEL法により標識するようにしてもよい。

(7) 本発明においてプローブとする核酸は、DNA、RNA、PNA、その他修飾されたものを含むものである。

(8) 本発明においては、生体組織切片に含まれる特定のタンパク質の検出を行うようにしてもよい。

(9) 本発明においては、目的とするタンパク質を検出するための標識された特異的な結合をする物質が、抗原抗体反応によって結合するようにしてもよい。

(10) 本発明においては、核酸を標識とした場合には、ターゲットには核酸は勿論のこと、核酸以外にも、タンパク質やその他の低分子物質も含むものである。

(11) 本発明における検出対象としては、DNA、RNA、タンパク質、低分子化合物、その他の試料中に含まれる物質が考えられる。

(12) 上記した実施の形態ならびに上記した(1)乃至(11)に示す変形例は、適宜に組み合わせるようにしてもよい。

産業上の利用可能性

[0037] 本発明は、医学や生化学などのライフサイエンスの分野における生体組織の分析に利用されるものである。

請求の範囲

- [1] 分析の対象である生体試料に超短パルスレーザー光を照射してアブレーションすることにより、前記生体試料に含まれる分子を構成元素に原子化し、前記原子化した構成元素をイオン化し、前記イオン化した構成元素を分析することにより、前記生体試料中の分析を目的とする分子を分析する
- ことを特徴とするレーザーアブレーションを用いた生体試料の分析方法。
- [2] 請求項1に記載のレーザーアブレーションを用いた生体試料の分析方法において、
- 、
- 前記生体試料中の分析を目的とする分子に対して特異的な結合をする物質を直接的あるいは間接的に標識し、前記標識された物質が結合された分子を分析することにより、前記生体試料中の分析を目的とする分子を分析する
- ことを特徴とするレーザーアブレーションを用いた生体試料の分析方法。
- [3] 請求項2に記載のレーザーアブレーションを用いた生体試料の分析方法において、
- 、
- 前記標識された特異的な結合をする物質が、核酸である
- ことを特徴とするレーザーアブレーションを用いた生体試料の分析方法。
- [4] 請求項1、2または3のいずれか1項に記載のレーザーアブレーションを用いた生体試料の分析方法において、
- 前記生体試料中の分析を目的とする分子は、核酸である
- ことを特徴とするレーザーアブレーションを用いた生体試料の分析方法。
- [5] 請求項3に記載のレーザーアブレーションを用いた生体試料の分析方法において、
- 、
- 前記標識された特異的な結合をする物質である核酸は、
- DNA、RNA、PNA、その他修飾されたものを含むものである
- ことを特徴とするレーザーアブレーションを用いた生体試料の分析方法。
- [6] 請求項2、3、4または5のいずれか1項に記載のレーザーアブレーションを用いた生体試料の分析方法において、
- 前記標識された特異的な結合をする物質が、ハイブリダイゼーションによって結合

する

ことを特徴とするレーザーアブレーションを用いた生体試料の分析方法。

- [7] 請求項2、3、4または5のいずれか1項に記載のレーザーアブレーションを用いた生体試料の分析方法において、

前記標識された特異的な結合をする物質がアプタマーである

ことを特徴とするレーザーアブレーションを用いた生体試料の分析方法。

- [8] 請求項3、4、5、6または7のいずれか1項に記載のレーザーアブレーションを用いた生体試料の分析方法において、

前記核酸の標識は、TUNEL法による

ことを特徴とするレーザーアブレーションを用いた生体試料の分析方法。

- [9] 請求項1または2のいずれか1項に記載のレーザーアブレーションを用いた生体試料の分析方法において、

前記生体試料中の分析を目的とする分子は、タンパク質である

ことを特徴とするレーザーアブレーションを用いた生体試料の分析方法。

- [10] 請求項9に記載のレーザーアブレーションを用いた生体試料の分析方法において、

前記タンパク質を分析するための標識された特異的な結合をする物質が、抗原抗体反応によって結合する

ことを特徴とするレーザーアブレーションを用いた生体試料の分析方法。

- [11] 請求項2、3、4、5、6、7、8、9または10のいずれか1項に記載のレーザーアブレーションを用いた生体試料の分析方法において、

前記標識は、元素標識である

ことを特徴とするレーザーアブレーションを用いた生体試料の分析方法。

- [12] 請求項11に記載のレーザーアブレーションを用いた生体試料の分析方法において、

前記元素標識は、安定同位元素標識である

ことを特徴とするレーザーアブレーションを用いた生体試料の分析方法。

- [13] 請求項1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11または12のいずれか1項に記載のレー

レーザーアブレーションを用いた生体試料の分析方法において、

前記イオン化した構成元素の分析は、質量分析である

ことを特徴とするレーザーアブレーションを用いた生体試料の分析方法。

- [14] 請求項13に記載のレーザーアブレーションを用いた生体試料の分析方法において、

前記質量分析は、飛行時間法による質量分析である

ことを特徴とするレーザーアブレーションを用いた生体試料の分析方法。

- [15] 請求項2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13または14のいずれか1項に記載のレーザーアブレーションを用いた生体試料の分析方法において、

標識として複数種の標識を用いることによりマルチチャンネル化し、分析の目的の分子として同一の生体試料中の少なくとも2種類以上の分子を分析する

ことを特徴とするレーザーアブレーションを用いた生体試料の分析方法。

- [16] 請求項1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14または15のいずれか1項に記載のレーザーアブレーションを用いた生体試料の分析方法において、

前記生体試料を顕微鏡で観察して得られた組織像と、前記アブレーションしたスポットの位置とを対応させることにより、分析の目的とする分子の前記生体試料内局在を分析する

ことを特徴とするレーザーアブレーションを用いた生体試料の分析方法。

- [17] 請求項1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15または16のいずれか1項に記載のレーザーアブレーションを用いた生体試料の分析方法において、

前記超短パルスレーザー光は、パルス時間幅が1フェムト秒以上1ピコ秒以下であり、尖頭値出力が1メガワット以上10ギガワット以下である

ことを特徴とするレーザーアブレーションを用いた生体試料の分析方法。

- [18] 請求項1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16または17のいずれか1項に記載のレーザーアブレーションを用いた生体試料の分析方法において、

前記生体試料は、生体組織切片または凍結サンプルである

ことを特徴とするレーザーアブレーションを用いた生体試料の分析方法。

- [19] 分析の対象である生体試料に照射して、該生体試料をアブレーションすることによ

り、前記生体試料に含まれる分子を構成元素に原子化し、前記原子化した構成元素をイオン化する超短パルスレーザー光を出射可能な超短パルスレーザー発生装置と、

前記超短パルスレーザー発生装置から出射された超短パルスレーザー光によってイオン化された構成元素を導入して分析する分析器と、

前記分析の対象である生体試料の形状を観察するための顕微鏡装置と
を有することを特徴とするレーザーアブレーションを用いた生体試料の分析装置。

[20] 請求項19に記載のレーザーアブレーションを用いた生体試料の分析装置において、

前記顕微鏡装置は、正立顕微鏡装置であり、

前記正立顕微鏡装置の対物レンズを前記生体試料の上面に配置するとともに、前記超短パルスレーザー発生装置からの超短パルスレーザー光の照射を前記生体試料の下面から行う

ことを特徴とするレーザーアブレーションを用いた生体試料の分析装置。

[21] 請求項19に記載のレーザーアブレーションを用いた生体試料の分析装置において、

前記顕微鏡装置は、正立顕微鏡装置であり、

前記正立顕微鏡装置の対物レンズを前記生体試料の上面に配置するとともに、前記超短パルスレーザー発生装置からの超短パルスレーザー光の照射を前記生体試料の上面から行う

ことを特徴とするレーザーアブレーションを用いた生体試料の分析装置。

[22] 請求項19に記載のレーザーアブレーションを用いた生体試料の分析装置において、

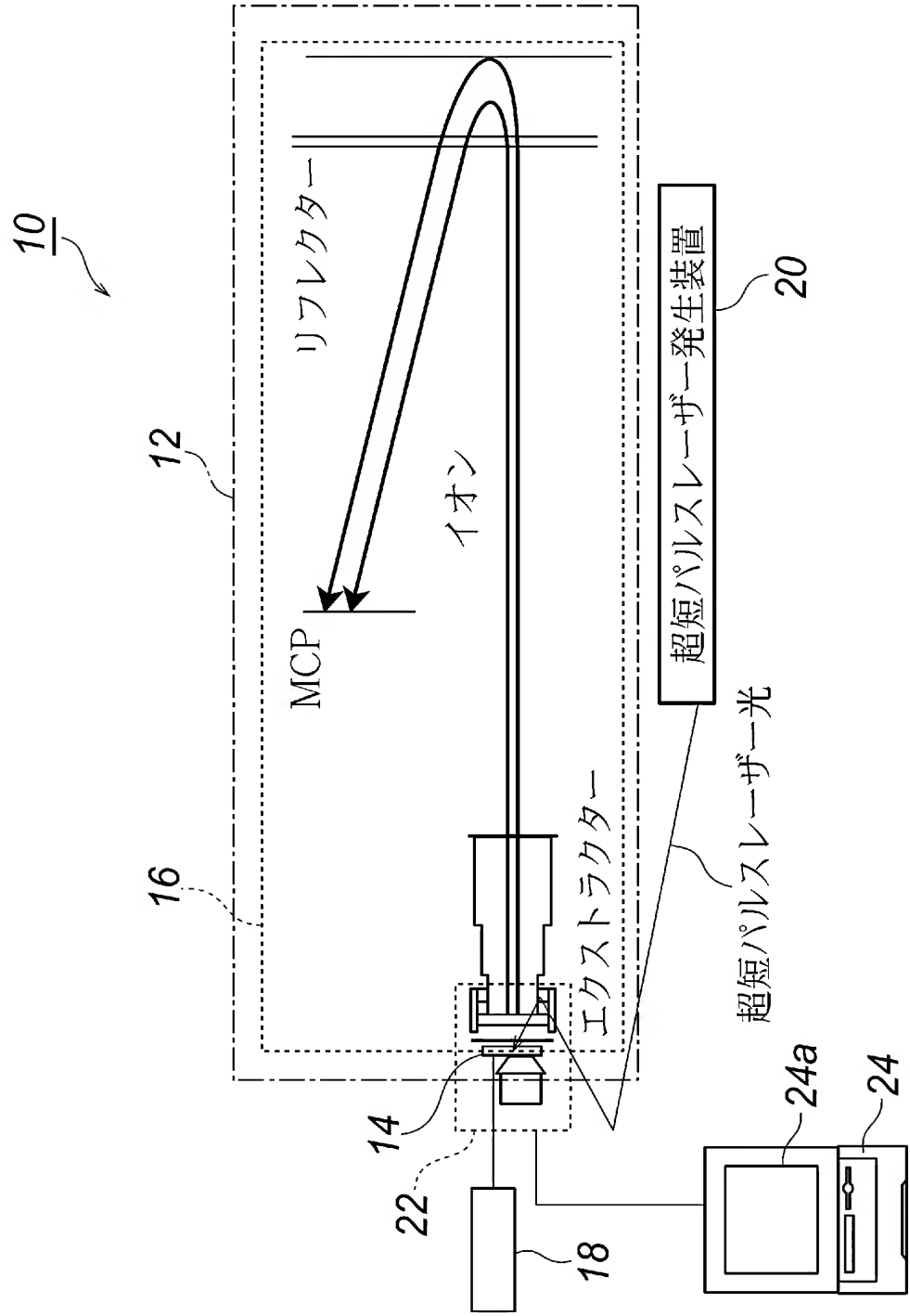
前記顕微鏡装置は、倒立顕微鏡装置であり、

前記倒立顕微鏡装置の対物レンズを前記生体試料の下面に配置するとともに、前記超短パルスレーザー発生装置からの超短パルスレーザー光の照射を前記生体試料の上面から行う

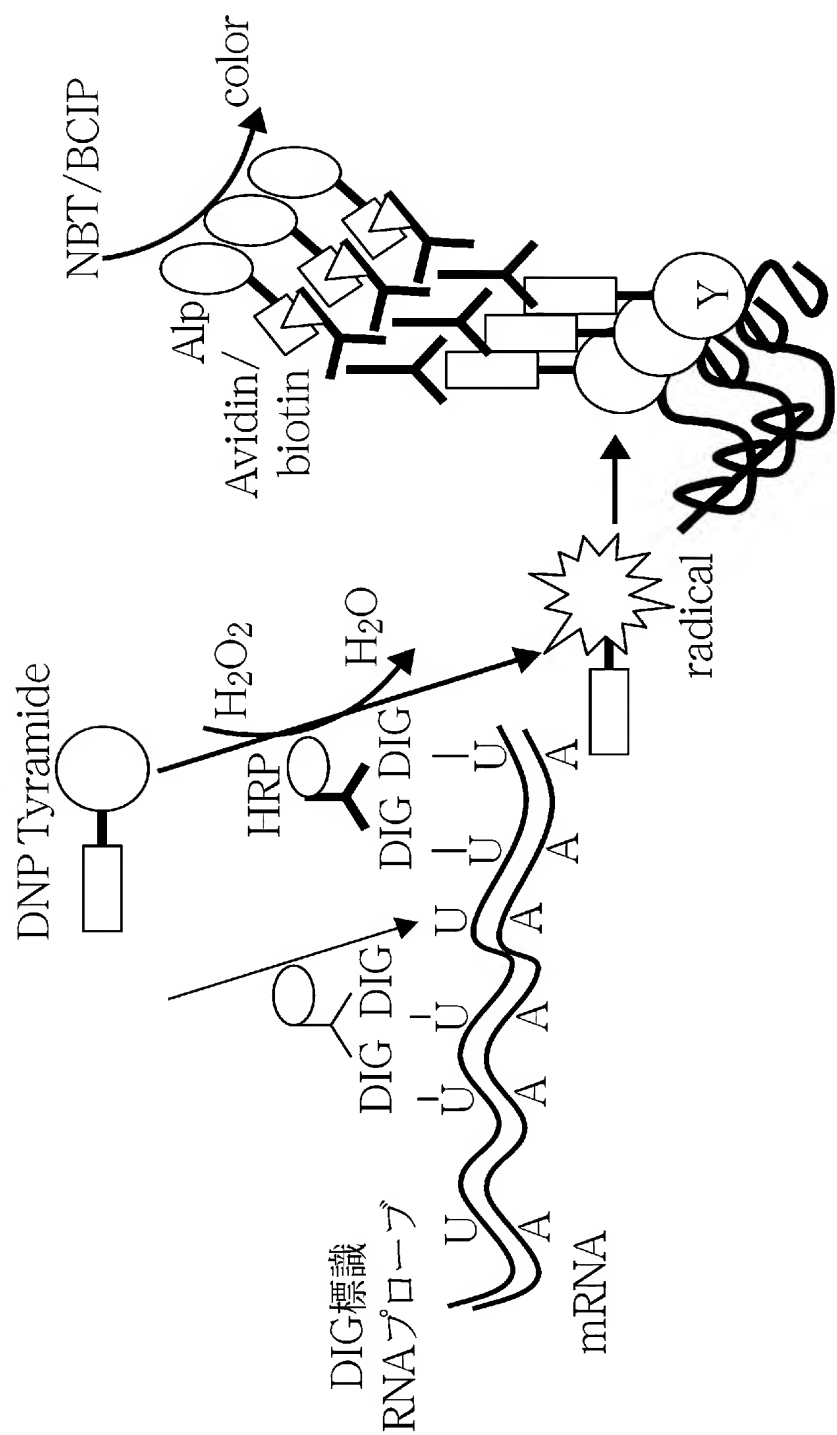
ことを特徴とするレーザーアブレーションを用いた生体試料の分析装置。

- [23] 請求項19に記載のレーザーアブレーションを用いた生体試料の分析装置において、
前記顕微鏡装置は、倒立顕微鏡装置であり、
前記倒立顕微鏡装置の対物レンズを前記生体試料の下面に配置するとともに、前記超短パルスレーザー発生装置からの超短パルスレーザー光の照射を前記生体試料の下面から行う
ことを特徴とするレーザーアブレーションを用いた生体試料の分析装置。
- [24] 請求項19、20、21、22または23のいずれか1項に記載のレーザーアブレーションを用いた生体試料の分析装置において、
前記超短パルスレーザー発生装置は、パルス時間幅が1フェムト秒以上1ピコ秒以下であり、尖頭値出力が1メガワット以上10ギガワット以下である超短パルスレーザー光を出射する
ことを特徴とするレーザーアブレーションを用いた生体試料の分析装置。
- [25] 請求項19、20、21、22、23または24のいずれか1項に記載のレーザーアブレーションを用いた生体試料の分析装置において、さらに、
前記顕微鏡装置により観察された画像を解析する画像解析装置と
を有することを特徴とするレーザーアブレーションを用いた生体試料の分析装置。
- [26] 請求項19、20、21、22、23、24または25のいずれか1項に記載のレーザーアブレーションを用いた生体試料の分析装置において、
前記生体試料は、生体組織切片または凍結サンプルである
ことを特徴とするレーザーアブレーションを用いた生体試料の分析装置。

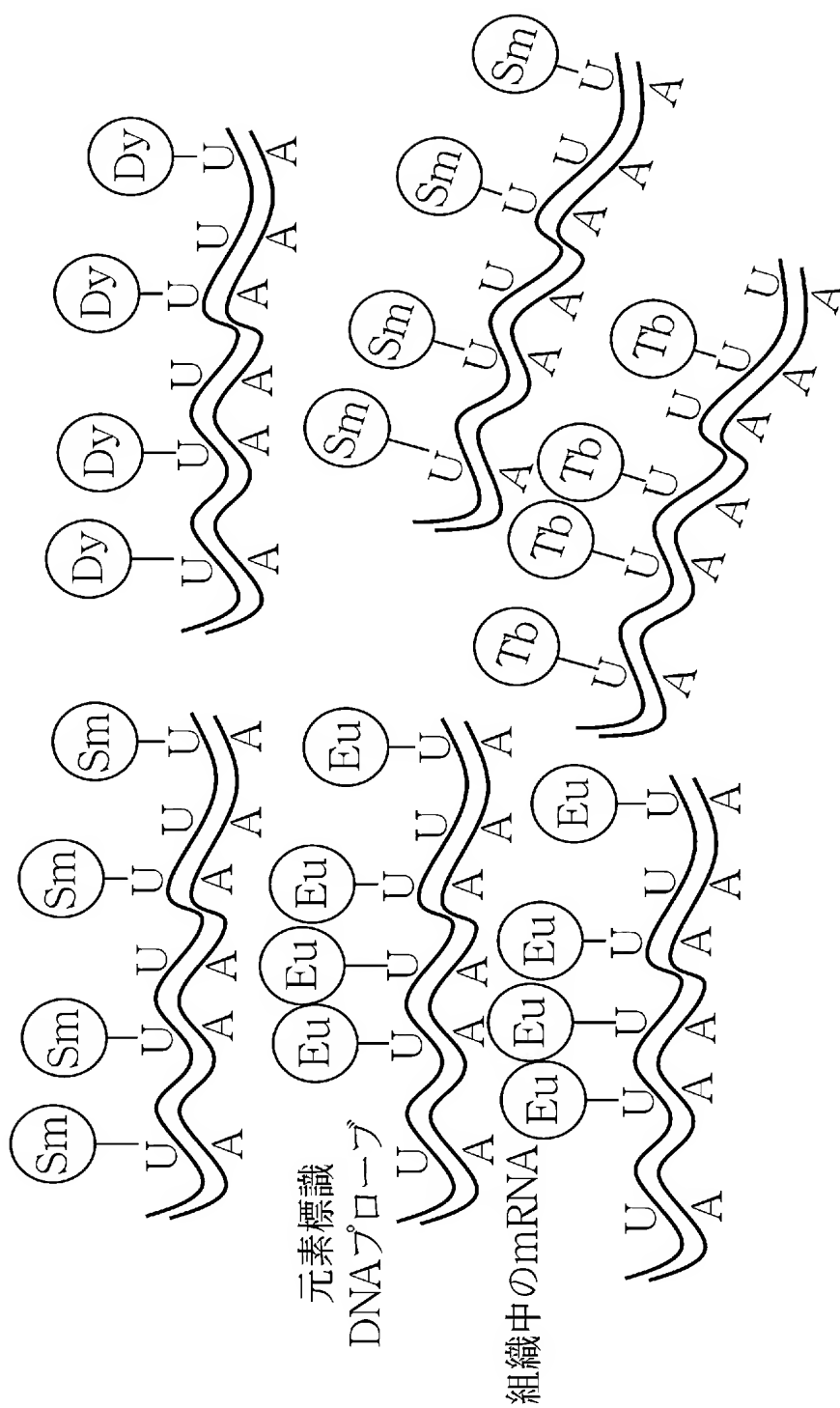
[図1]



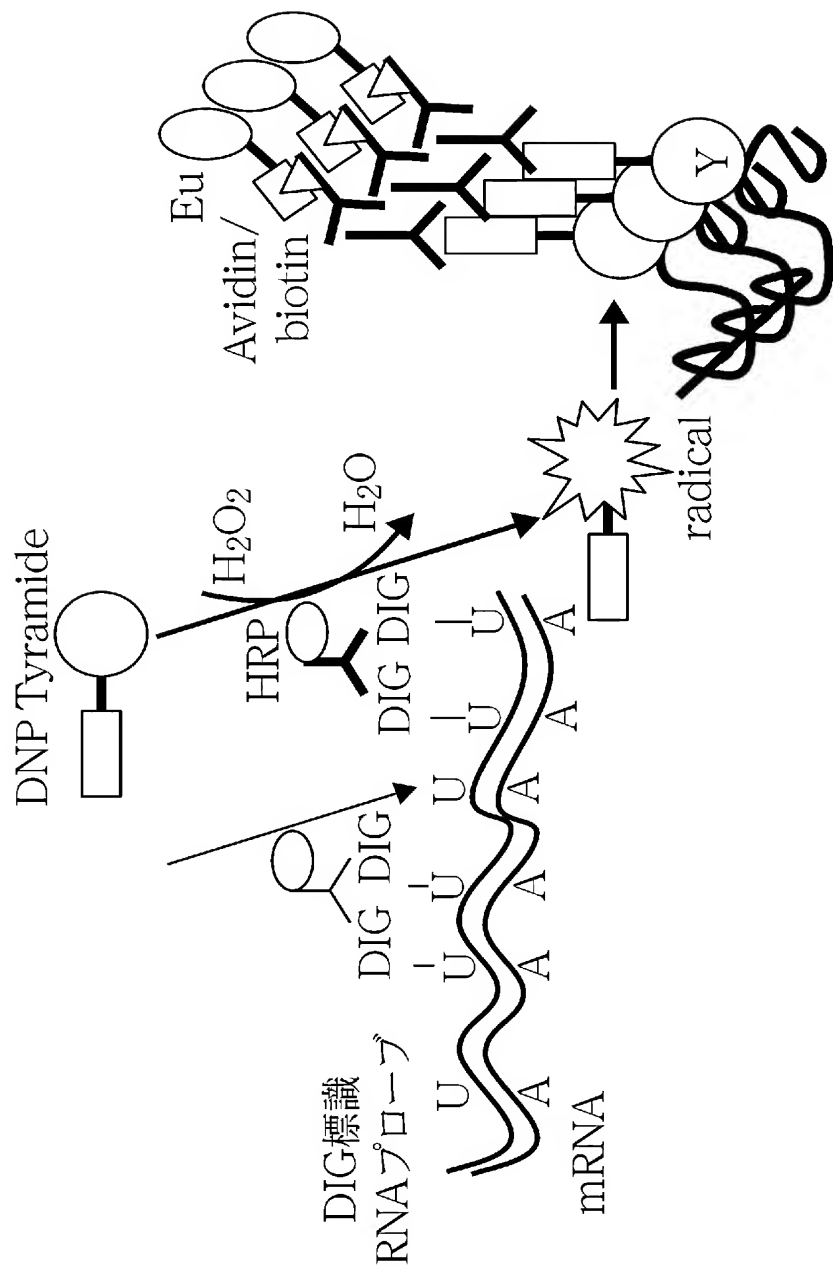
[図2]



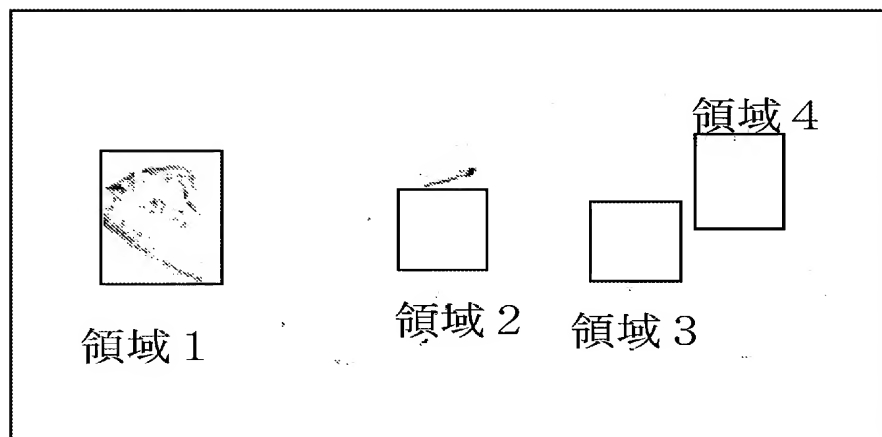
[図3]



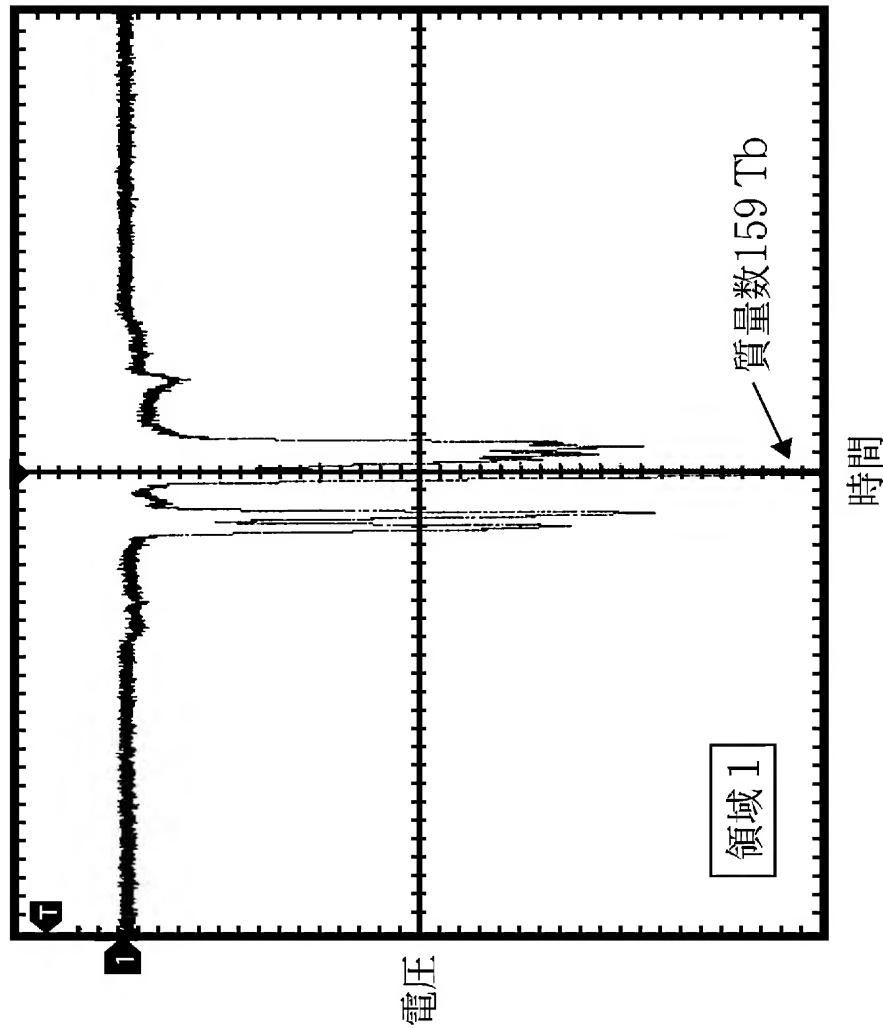
[図4]



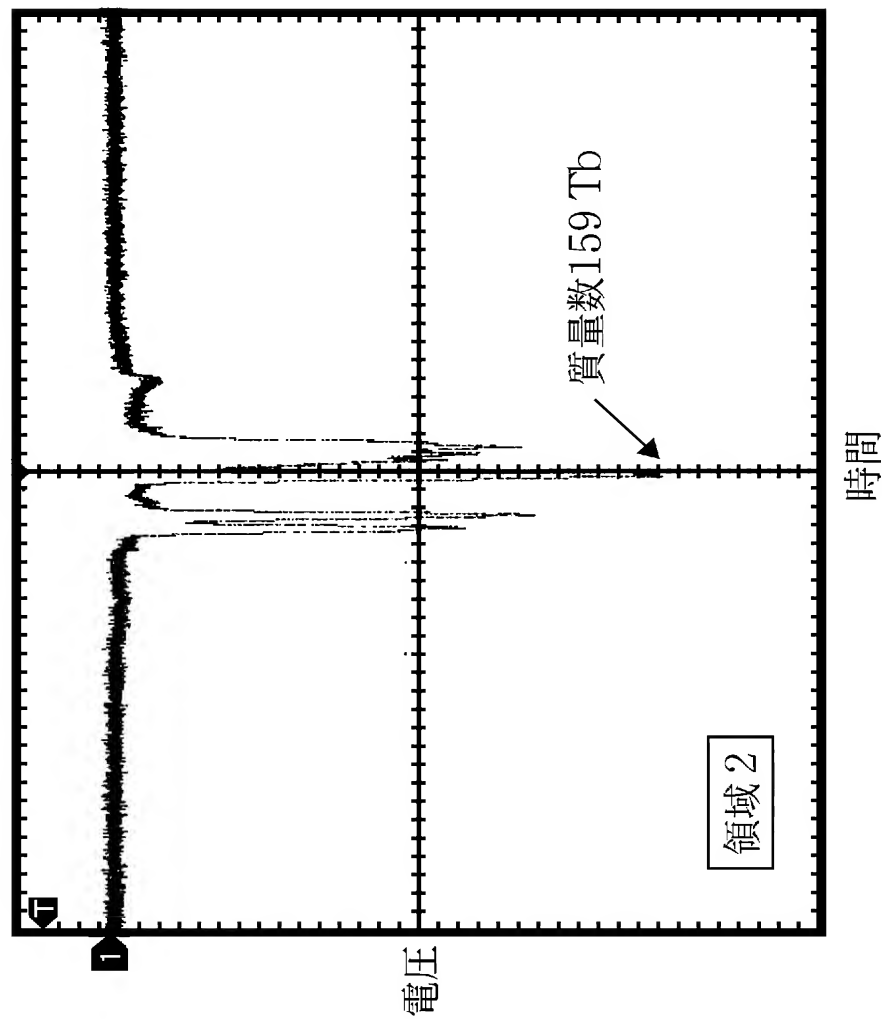
[図5]



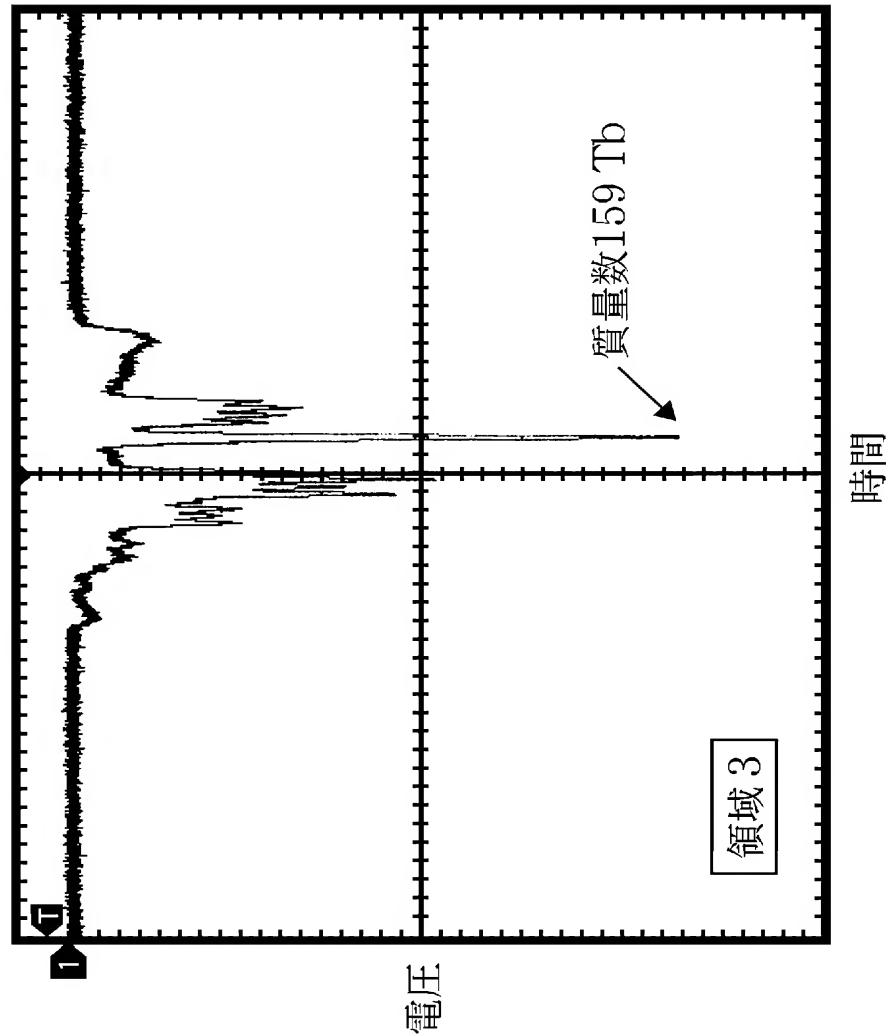
[図6]



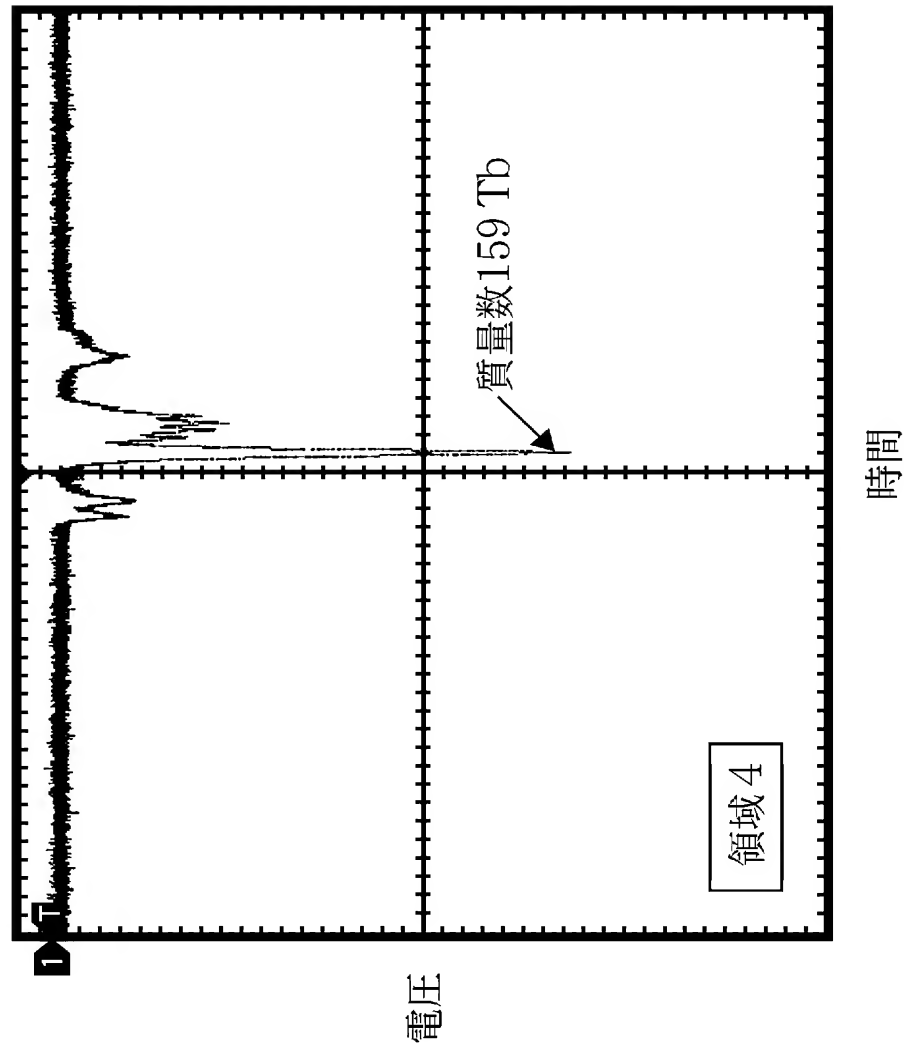
[図7]



[図8]



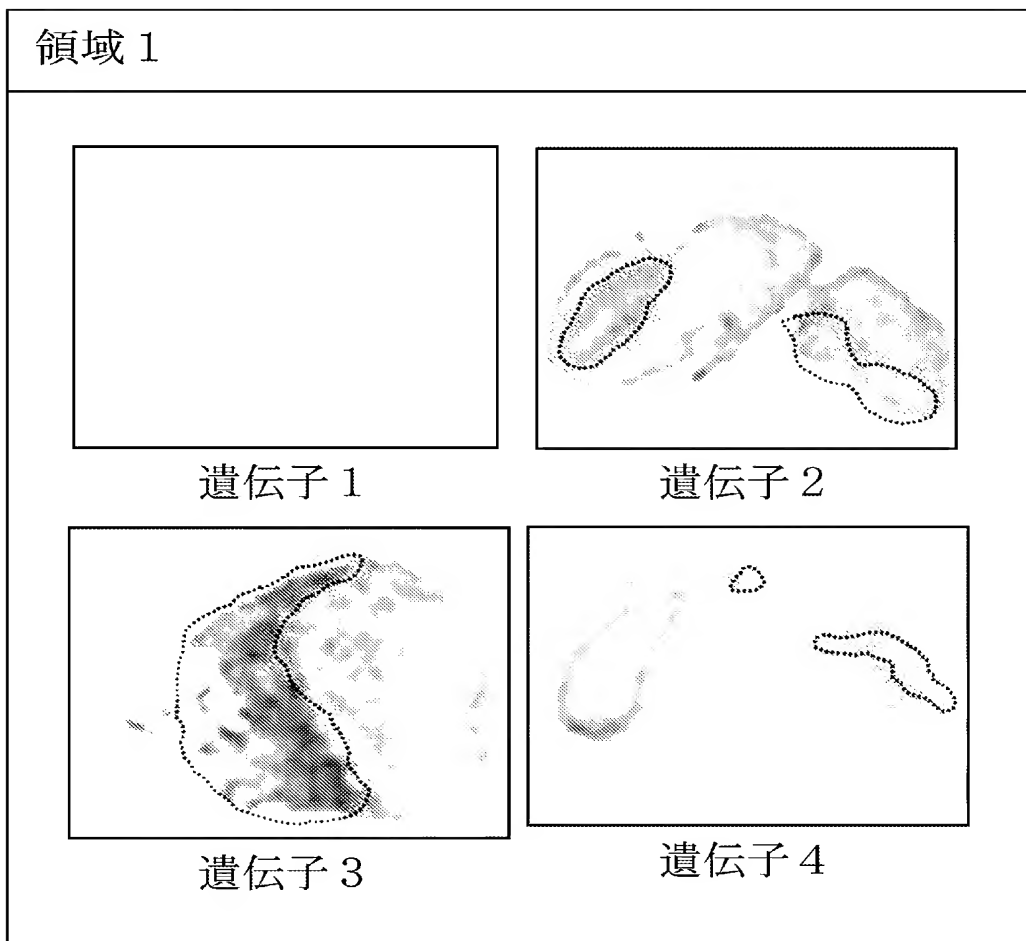
[図9]



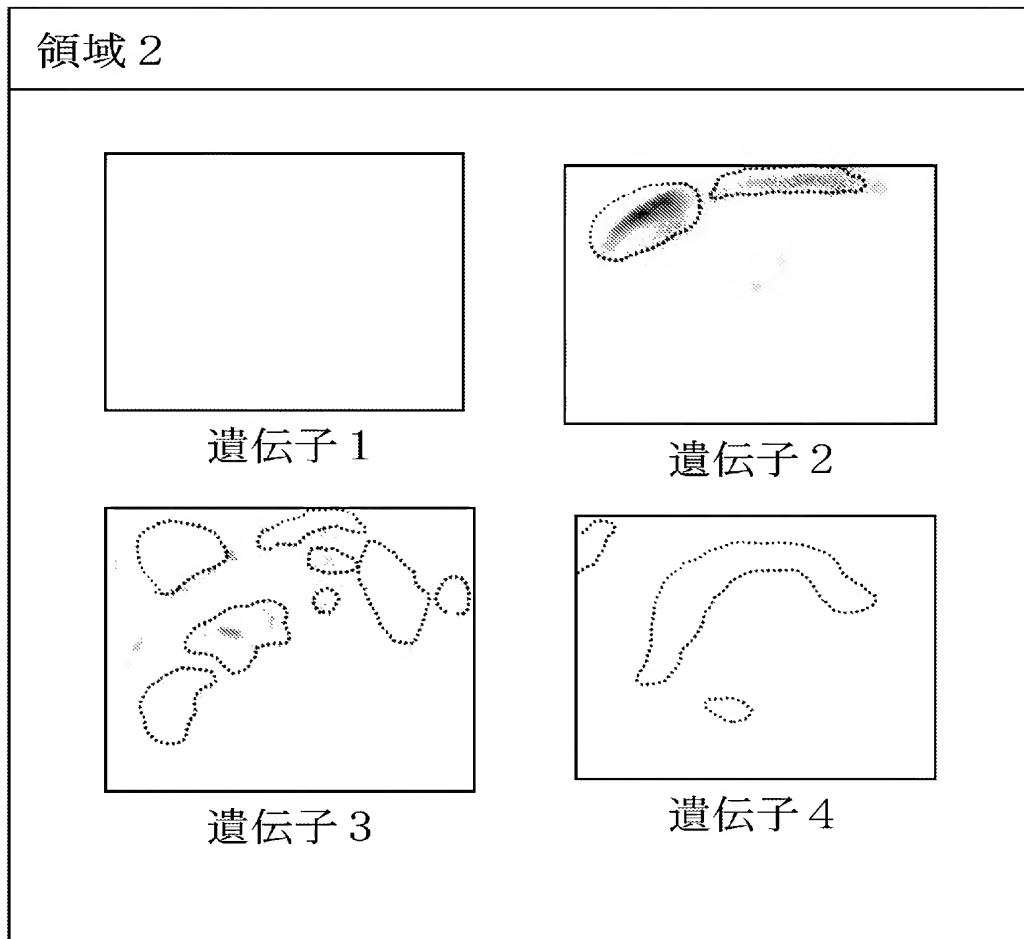
[図10]

領域	強度比			
	1	2	3	4
遺伝子1(Tph2)	0	0	392.0	0
遺伝子2(MaoB)	620.4	981.7	363.0	161.7
遺伝子3(AADC)	870.4	1382.1	360.4	521.9
遺伝子4(Htr1B)	281.0	455	197.0	345.0

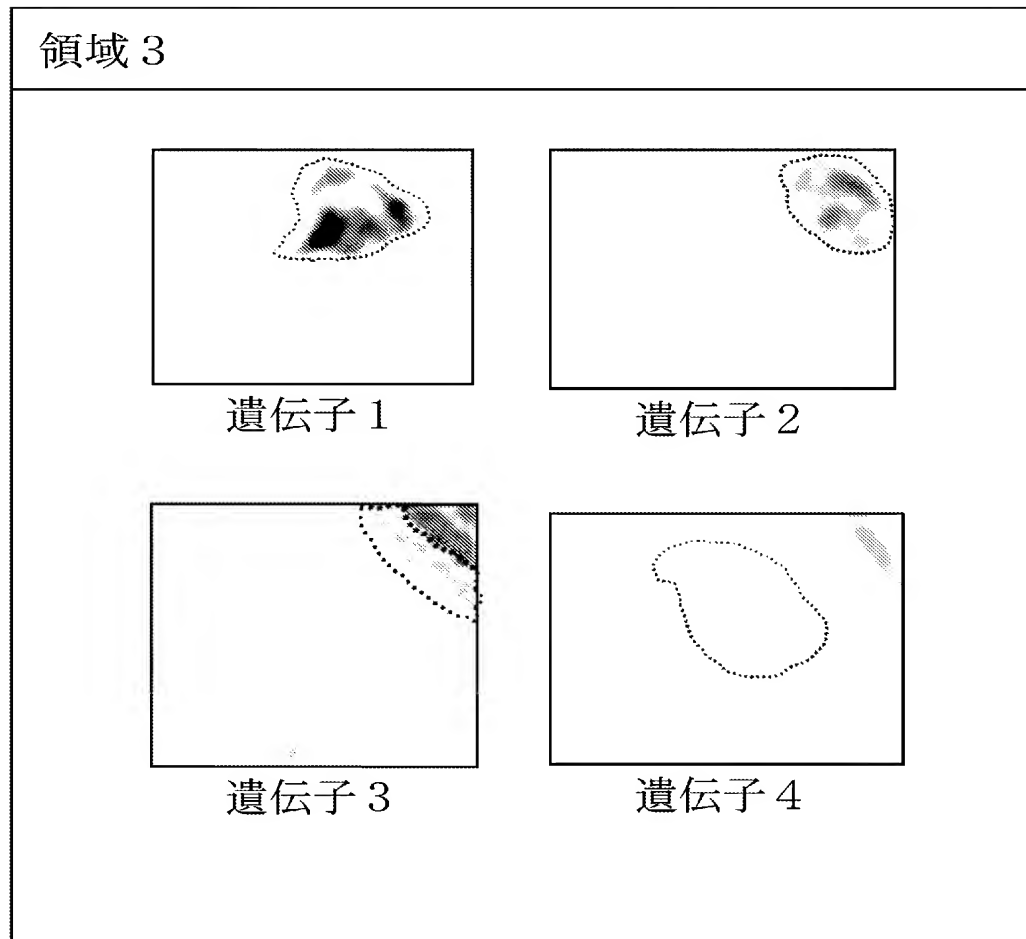
[図11]



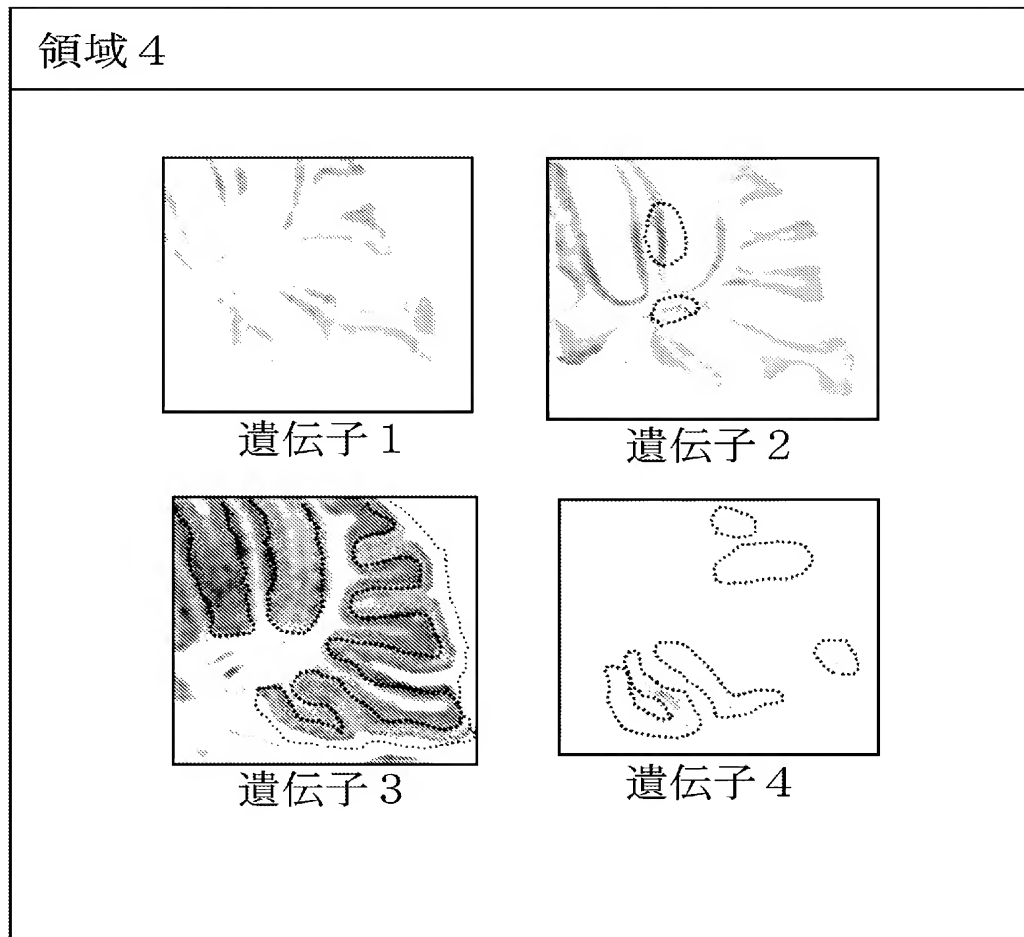
[図12]



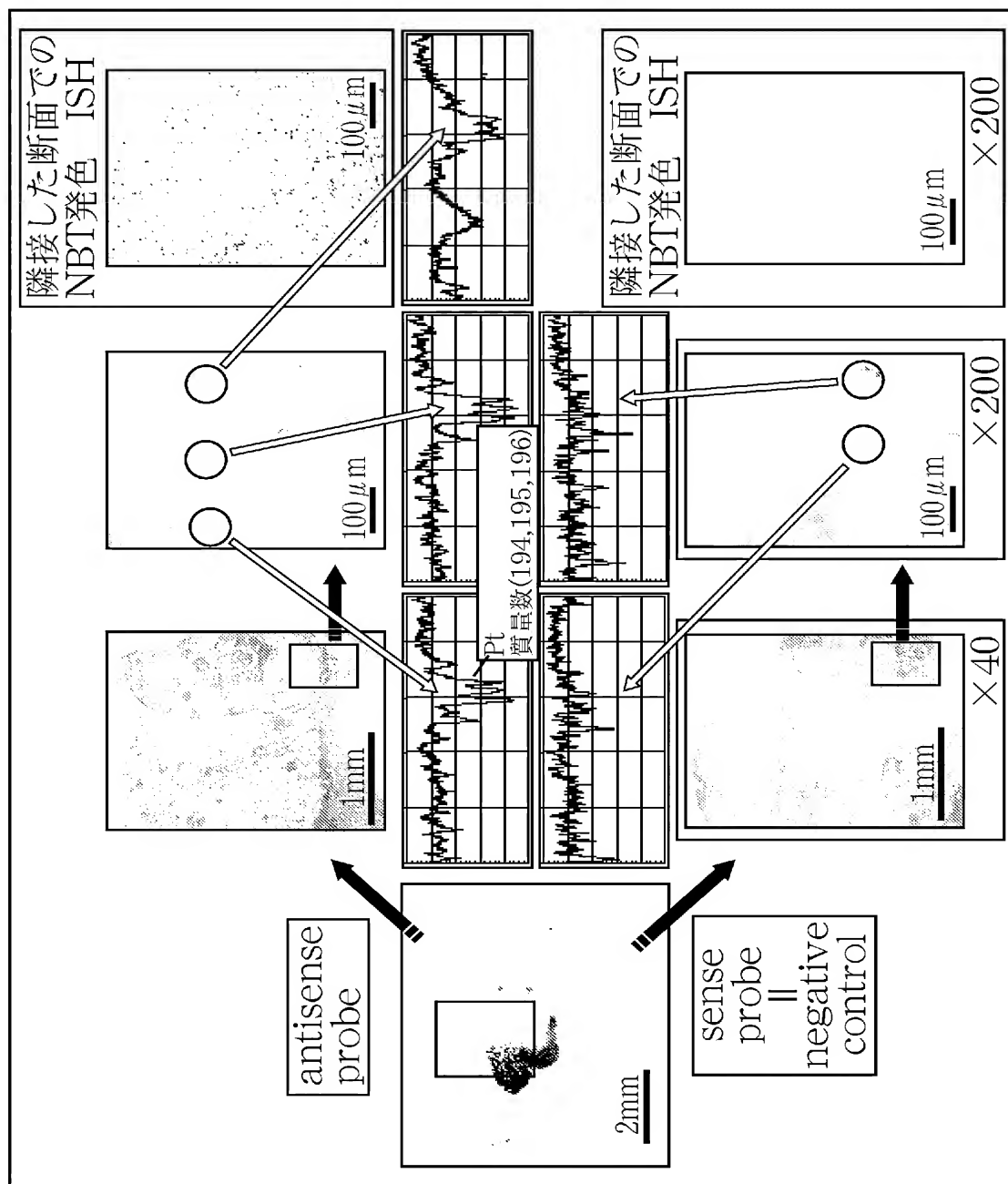
[図13]



[図14]



[図15]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/005809

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ G01N27/64, C12N15/09, C12Q1/68, G01N27/62, 33/483, 33/50,
H01J49/10, 49/40

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ G01N27/62-27/70, H01J49/00-49/48

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2005
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2005	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2005

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
JSTPlus (JOIS)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X <u>Y</u>	JP 2002-328114 A (The Institute of Physical and Chemical Research), 15 November, 2002 (15.11.02), Full text; all drawings & EP 1376120 A1	1-6, 11-15, 17, 18 <u>7, 8</u>
Y	WO 2002/082051 A2 (TUBBS Kemmons A), 17 October, 2002 (17.10.02), Page 62, lines 7 to 18 & JP 2005-503537 A	7
Y	WO 2002/058533 A2 (SLANETZ Alfred E), 01 August, 2002 (01.08.02), Page 68, lines 23 to 25 & JP 2004-534519 A	8



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
23 June, 2005 (23.06.05)

Date of mailing of the international search report
12 July, 2005 (12.07.05)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/005809

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2004/019026 A1 (Yoshihide HAYASHIZAKI), 04 March, 2004 (04.03.04), Full text; all drawings & EP 1536226 A1	1, 2, 11-15, 17, 18

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/005809

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

See extra sheet .

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: 1-8, 11-15, 17 and 18 .

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/005809

Continuation of Box No.III of continuation of first sheet(2)

The matter to common to the invention of claims 1-8, 11-15, 17 and 18, the invention of claims 9 and 10 and the invention of claims 16 and 19-26 is irradiating of a labeled biosample with ultrashort pulse laser beams to thereby effect an ablation thereof.

However, search has revealed that this common matter is not novel as it is disclosed in the reference (1) JP 2002-328114 A (The Institute of Physical and Chemical Research) 15 November, 2002 (15.11.02).

Consequently, the common matter falls within the category of prior art and hence this common matter is not a special technical feature within the meaning of PCT Rule 13.2, second sentence.

Therefore, there is no matter common to all of the invention of claims 1-8, 11-15, 17 and 18, the invention of claims 9 and 10 and the invention of claims 16 and 19-26.

Since there exists no other common feature which can be considered as a special technical feature within the meaning of PCT Rule 13.2, second sentence, no technical relationship within the meaning of PCT Rule 13 can be found among the different inventions.

Therefore, it is apparent that the invention of claims 1-8, 11-15, 17 and 18, the invention of claims 9 and 10 and the invention of claims 16 and 19-26 do not satisfy the requirement of unity of invention.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl.⁷ G01N27/64, C12N15/09, C12Q1/68, G01N27/62, 33/483, 33/50, H01J49/10, 49/40

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl.⁷ G01N27/62-27/70, H01J49/00-49/48

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2005年
日本国実用新案登録公報	1996-2005年
日本国登録実用新案公報	1994-2005年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JSTPlus (JOIS)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	JP 2002-328114 A (理化学研究所) 2002.11.15, 全文, 全図 & EP 1376120 A1	1-6, 11-15, 17, 18
<u>Y</u>		<u>7, 8</u>
Y	WO 2002/082051 A2 (TUBBS Kemmons A) 2002.10.17, 第62頁第7-18行 & JP 2005-503537 A	7

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
- 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
- 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
- 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
- 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
- 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
- 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
- 「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

23.06.2005

国際調査報告の発送日

12.7.2005

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

高場 正光

電話番号 03-3581-1101 内線 3292

2W

3311

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	WO 2002/058533 A2 (SLANETZ Alfred E) 2002.08.01, 第 68 頁第 23-25 行 & JP 2004-534519 A	8
X	WO 2004/019026 A1 (林崎良英) 2004.03.04, 全文, 全図 & EP 1536226 A1	1, 2, 11-15, 17, 18

第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。
（特別ページを参照）

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☒ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

請求の範囲 1－8, 11－15, 17, 18

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

請求の範囲1-8, 11-15, 17, 18に係る発明、請求の範囲9, 10に係る発明及び請求の範囲16, 19-26に係る発明の共通事項は、標識化された生体試料に超短パルスレーザー光を照射してアブレーションする点である。

しかしながら、調査の結果、当該共通事項は、
文献1 JP 2002-328114 A (理化学研究所) 2002.11.15
に開示されているから、新規でないことが明らかとなった。

結果として、前記各共通事項は先行技術の域を出ないから、PCT規則13.2の第2文の意味において、前記各共通事項は特別な技術的特徴ではない。

それ故、請求の範囲1-8, 11-15, 17, 18に係る発明、請求の範囲9, 10に係る発明及び請求の範囲16, 19-26に係る発明の全てに共通する事項はない。

PCT規則13.2の第2文の意味において特別な技術的特徴と考えられる他の共通事項は存在しないので、それらの相違する発明の間にPCT規則13の意味における技術的な関連を見いだすことはできない。

以上から、請求の範囲1-8, 11-15, 17, 18に係る発明、請求の範囲9, 10に係る発明及び請求の範囲16, 19-26に係る発明は、発明の単一性を満たしていないことが明らかである。